

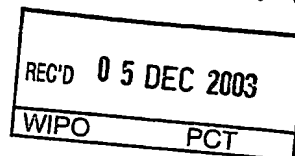
10 / 529 554

31 MAR 2005

R E P U B L I Q U E F R A N C A I S E



PCT/FR03/02873



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 09 OCT. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété Industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

1er dépôt



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

INPI
N° 11354*02

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 IV / 010801

REMISE DES PIÈCES DATE 1 OCT 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0212119 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 01 OCT. 2002		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240090 D20660 FFP			
<input checked="" type="checkbox"/> Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale N° _____ Date _____			
ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____			
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/>		N° _____ Date _____	
<input checked="" type="checkbox"/> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE DETECTION ET DE COMPTAGE DE MICROORGANISMES DANS UN ECHANTILLON			
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique			
Nom ou dénomination sociale METIS BIOTECHNOLOGIES			
Prénoms _____			
Forme juridique SOCIETE ANONYME			
N° SIREN 429752372			
Code APE-NAF _____			
Domicile ou siège	Rue Pépinière d'entreprises Ester Technopole, 87000 LIMOGES		
	Code postal et ville _____		
	Pays FRANCE		
Nationalité Française			
N° de téléphone (facultatif) _____		N° de télécopie (facultatif) _____	
Adresse électronique (facultatif) _____			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



1er dépôt

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ****REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

page 2/2



RÉSERVÉ À L'INPI	
REMBSE DES PIÈCES	
DATE	
LIEU 1 OCT 2002	
75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0212119	
DB 540 W / 010801	
Vos références pour ce dossier :	
(facultatif) 240090 FFP	
Nom	
Prénom	
Cabinet ou Société	
Cabinet REGIMBEAU	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	
Adresse	Rue
	Code postal et ville
	Pays
20, rue de Chazelles	
75847 PARIS CEDEX 17	
01 44 29 35 00	
01 44 29 35 99	
info@regimbeau.fr	
N° de téléphone (facultatif)	
N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)	
7 INVENTEUR(S)	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	
<input type="checkbox"/> Oui	
<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RÉGULARITÉ	
Établissement immédiat ou établissement différé	
<input checked="" type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	
Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt	
<input type="checkbox"/> Oui	
<input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES	
Uniquement pour les personnes physiques	
<input type="checkbox"/> Requis pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)	
<input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG []	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)	
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

La présente invention a pour objet un procédé de détection et de
5 comptage de microorganismes dans un échantillon ainsi qu'un milieu
d'enrichissement sélectif du microorganisme recherché.

La présente invention s'applique à la détection de microorganismes tels
que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*,
Mycobacterium avium paratuberculosis et *Legionella pneumophila*. Cette détection
10 est effectuée préférentiellement par cytométrie en flux à partir d'échantillons d'une
quelconque nature tels que les échantillons alimentaires, solides, liquides, végétaux,
animaux... ainsi que des échantillons de tissus animaux et, en particulier, humains.

Les contaminations microbiennes dans l'industrie agroalimentaire sont
une préoccupation majeure, car elles sont à l'origine d'importantes dégradations et
15 d'une immobilisation des marchandises dans l'attente d'une analyse libératoire. Les
critères attendus des analyses microbiologiques sont de deux ordres. D'une part, il
faut pouvoir contrôler le plus précisément possible l'état de la contamination, ce qui
nécessite d'avoir des méthodes d'analyses très sensibles et discriminantes. D'autre
part, ces méthodes doivent être rapides pour permettre une libération anticipée des
20 lots de production, et doivent rendre possible une analyse microbiologique
prédictive.

Le critère de rapidité est déterminant si l'on veut éviter de
commercialiser un produit à risque. Les analyses classiques nécessitent toujours un
temps d'incubation très long par rapport aux exigences d'une production
25 alimentaire. De plus, elles ne prennent pas en compte les bactéries qui ont perdu leur
aptitude à se multiplier, alors que celles-ci conservent des activités métaboliques
susceptibles de se réveiller à la faveur d'un événement particulier tel que la remontée
en température suite à une rupture de la chaîne du froid ou le passage dans
l'organisme du consommateur.

Par ailleurs, dans l'environnement, la rapidité et la sensibilité des méthodes d'analyses microbiennes appliquées aux eaux techniques ou de consommation sont déterminantes, ces eaux pouvant contaminer directement les personnes (eaux de consommation) ou indirectement par pollution de l'environnement (légionnelles dans l'air climatisé, contamination des surfaces en contact avec les aliments).

Parmi les techniques microbiologiques classiques pour la détection et le comptage des microorganismes, la culture en boîte de Pétri est très largement utilisée.

10 La méthode de comptage sur boîte de Pétri, est la méthode conventionnelle d'estimation des populations microbiennes. La croissance et la division sont les fondements de cette méthode d'analyse microbiologique pour rechercher les bactéries viables. Dans ce cas, la cultivabilité est associée à la viabilité. La cultivabilité, en fait, est définie par la capacité d'une seule cellule à
15 donner une population observable ou visible à la surface d'une boîte de culture.

Cette technique est utilisée depuis des décennies et a notamment montré son efficacité dans la protection de la santé des personnes à un coût relativement faible. Ces dernières années, de nombreuses innovations ont porté sur la conception des milieux de culture (milieux chromogènes), l'automatisation de la préparation des
20 milieux de culture, la dilution de l'échantillon broyé dans le milieu, l'étalement et le comptage des colonies sur boîte de Pétri (Garcia-Armesto *et al.*, 1993). Cependant, elle est défailante sur deux aspects. Tout d'abord, elle est peu sensible car, dans son principe, elle nécessite de faire pousser les bactéries sur des milieux nutritifs dans une boîte de Pétri, lesdits milieux nutritifs étant d'une efficacité variable pour la
25 pousse sélective des germes, en fonction du produit agroalimentaire testé. Ensuite, la culture en boîte de Pétri nécessite que les germes recherchés soient dans des conditions physiologiques optimales pour pouvoir pousser dans un milieu nutritif sélectif. Or, il n'est pas rare que des bactéries présentes initialement dans un
échantillon ne soient plus détectables par les techniques classiques de microbiologie,

à savoir par la culture dans des milieux standards, et ceci peut s'expliquer de deux façons : soit les bactéries sont mortes à la suite d'un stress trop important (choc thermique, osmotique, manque de nutriments...), soit elles ont perdu leur capacité à proliférer dans les milieux de culture standard ; on dit alors que les bactéries sont viables mais non cultivables (Barer *et al.*, 1999). Il est donc important de pouvoir détecter ces bactéries dans un échantillon.

Récemment, il a été montré que quelques espèces cultivables de bactéries, lorsqu'elles sont soumises à un manque de nutriments ou à un autre stress physique (thermique, hydrique,...), peuvent entrer dans un état de survie cellulaire dans lequel elles ne sont pas détectables par des tests de cultivabilité (par exemple par culture sur boîte de Pétri).

C'est pourquoi, les techniques d'amplification de l'ADN, qui apportent une plus grande spécificité vis-à-vis des microorganismes recherchés et qui sont automatisables, ont été développées. Ces techniques consistent en la détection de séquences nucléotidiques spécifiques d'un microorganisme (après amplification génique). Cette approche ne permet cependant pas encore de compter les microorganismes dans un échantillon.

En terme de spécificité, les sondes génétiques (ADN, ARN, PNA, molecular beacons...) sont une alternative à l'utilisation d'anticorps fluorescents. Ces sondes doivent être marquées à l'aide d'un fluorochrome et s'hybrider sur les acides nucléiques des cellules étudiées sans que celles-ci n'aient été lysées au préalable : il s'agit alors d'hybridation *in situ*. Dans ce cas, les sondes utilisées ciblent l'ARN 16S ou 23S, ce qui permet à la fois d'assurer la spécificité de la détection et d'augmenter le signal lié au nombre de copies de cet ARN dans la cellule (Moter *et al.*, 2000).

D'autres techniques, telles que les méthodes immunologiques (dont les méthodes Elisa) consistent en la détection à l'aide d'anticorps des antigènes microbiens, par luminescence ou fluorescence. Si ces méthodes sont facilement automatisables et sensibles, elles donnent une information restreinte puisqu'elles ne

permettent pas de compter les microorganismes présents. De plus, ces méthodes sont parfois critiquées sur leur spécificité, les anticorps utilisés pouvant présenter des spectres de reconnaissance d'antigènes microbiens trop restreints (Tortorello *et al.*, 1994).

5 Quelles que soient les méthodes employées, elles nécessitent toutes une phase d'enrichissement des bactéries recherchées pour obtenir une sensibilité et une spécificité acceptables.

Les analyses cytométriques, dont la cytométrie en flux n'est qu'un exemple, présentent l'avantage de permettre une détection directe des germes qui
10 sont, au préalable, marqués par une molécule fluorescente. De plus, ce marquage peut rendre compte de la viabilité de la bactérie. La détection par un cytomètre en flux est directe et quantitative et ne prend que quelques minutes.

La cytométrie en flux, par son succès d'adaptation à la biologie médicale, est très bien positionnée pour une adaptation à l'analyse microbiologique à
15 haut débit (Alvarez-Barrientos *et al.*, 2000 ; Davey *et al.*, 1996). Une des caractéristiques techniques de la cytométrie en flux est qu'elle peut permettre, en moins de 24 h/ 48 h, des analyses de populations définies par des caractéristiques particulières de croissance (coliformes fécaux à 44°C, flores psychrophiles), qui après enrichissement dans un bouillon sélectif, peuvent être détectées directement
20 par cytométrie en flux, au lieu d'attendre qu'elles poussent sur un milieu spécifique.

Ces dernières années, de nombreux cytomètres commerciaux inutilisables pour la détection des microorganismes ont été développés pour l'analyse des cellules eucaryotes. Mais l'évolution des photomultiplicateurs, l'introduction des lasers et l'amélioration des systèmes optiques (focalisation, cellules d'analyses en
25 quartz) permettent aujourd'hui à la plupart des cytomètres de quantifier des bactéries et des virus (Salzman *et al.*, 1982, Steen *et al.*, 1986). Le progrès le plus significatif a consisté en l'adoption d'une mesure de la taille des cellules procaryotes ou eucaryotes analysées, par une photodiode tout d'abord, puis par un
-----photomultiplicateur. Ainsi, il est désormais possible de sélectionner pour l'analyse -----

de la fluorescence émise une population cellulaire de taille définie (les microorganismes par exemple). La fenêtre d'analyse ainsi créée permet donc de concentrer la puissance d'analyse du cytomètre sur des événements prédéfinis, permettant d'obtenir une bonne différenciation entre le signal de fluorescence émis
5 par le microorganisme et le bruit de fond de la matrice.

Les marqueurs fluorescents utilisés marquent des populations microbiennes dans leur globalité et sont d'un spectre d'action large : des intercalants de l'ADN, des marqueurs de potentiels membranaires ou de l'activité respiratoire des bactéries (Lopez-Amoros *et al.*, 1995 ; Grepori *et al.*, 2001). Aux signaux de
10 fluorescence est associée la mesure de la taille et de la granulosité du contenu intracellulaire. L'utilisation de molécules fluorescentes pour détecter des microorganismes viables par cytométrie en flux est à présent bien connue (Davey *et al.*, 1996 ; Nebe-von Caron *et al.*, 1995). Le principe est de détecter une activité enzymatique présente chez tous les microorganismes. Ce sont dans tous les cas des
15 activités à spectre très large et essentielles à la survie cellulaire. De multiples exemples sont décrits dans la littérature, les plus pertinents sont les substrats permettant de mettre en évidence l'ensemble des activités estérases comme la fluorescéine-di-acétate (FDA) ou son homologue la carboxy-fluorescéine-di-acétate (CFDA) (Breeuwer *et al.*, 1995).

20 Drocourt *et al.* (FR 2 764 305) décrivent un procédé de marquage de tous les microorganismes viables (marquage FDA et CFDA) dans un échantillon complexe, basé sur la détection des activités estérases et surtout la suppression à l'aide d'un contre-colorant de l'auto fluorescence de l'échantillon.

Breeuwer *et al.* (WO05/00660) décrivent un procédé de mesure de la
25 viabilité des microorganismes dans un échantillon, en utilisant des marqueurs fluorescents. Le procédé consiste à mesurer le temps requis pour qu'il se produise une perte de la moitié de la fluorescence émise par ces microorganismes.

Inoue *et al.* (EP 1 203 825) utilisent la polyméthine pour révéler une activité réductrice des ions nitrites dans les microorganismes. C'est une activité cellulaire *a priori* détectable chez toutes les bactéries.

Rocco *et al.* (WO00/34509) utilisent des antibiotiques sur lesquels sont greffés des molécules fluorescentes pour révéler les microorganismes.

Fazzi *et al.* (WO00/067065) ont mis au point une méthode qui permet de différencier les bactéries selon leur coloration de Gram, en utilisant un mélange d'acridine orange et de fluorescéine. La détection des populations microbiennes marquées se fait alors par cytométrie en flux.

Jespersen *et al.* (WO02/00036) ont également développé une méthode de coloration de Gram basée sur l'utilisation de molécules reconnaissant des différences structurales entre les bactéries à Gram positif (structures glycaniques à la surface des cellules) ou négatif (présence du lipopolysaccharide). Cependant, cette méthode ne permet pas la mesure de la viabilité des bactéries.

Pyle *et al.* (WO95/31481) utilisent le CTC comme molécule révélatrice de l'activité respiratoire des microorganismes. Cette détection est couplée à un enrichissement immuno-magnétique et/ou à une détection immunologique à l'aide d'anticorps marqués à la fluorescéine.

Cependant, les marqueurs fluorescents de viabilité cités ci-dessus ont un spectre beaucoup trop large pour apporter la spécificité nécessaire à la détection de microorganismes spécifiques.

L'association des technologies de biologie moléculaire (utilisation de sondes nucléotidiques marquées en fluorescence) à la cytométrie en flux est une piste qui a été engagée assez récemment (Amann *et al.*, 1995 ; Wallner *et al.*, 1995).

Cependant, si elle fonctionne bien pour des microorganismes à Gram négatif, des recherches sont encore nécessaires pour marquer spécifiquement les bactéries à Gram positif. Vlieger *et al.* (1992) décrivent l'utilisation de la cytométrie en flux pour détecter les acides nucléiques amplifiés par PCR par hybridation desdits fragments à des billes.

La cytométrie en flux a notamment été utilisée pour dénombrer les bactéries totales ou les levures dans du lait et des préparations de viandes, du lait fermenté, des végétaux surgelés ou du lait cru. Les marqueurs utilisés sont des marqueurs de viabilité (Breece *et al.*, 1995). A ce premier critère de sélection sont
5 ajoutés les critères morphologiques de taille et de structure, qui sont analysables par cytométrie en flux.

La détection plus spécifique de microorganismes (genres et espèces) dans les aliments concerne en particulier les flores pathogènes telles que *Salmonella*,
Listeria monocytogenes, *Escherichia coli* 0157:H7, *Staphylococcus aureus*,
10 *Brucella abortus* (McClelland *et al.*, 1994 ; Iannelli *et al.*, 1998 ; Pinder *et al.*, 1994 ; Skjerve *et al.*, 1990, 1991 ; Tomayasu *et al.*, 1998 ; Tortorello *et al.*, 1998). Les marqueurs fluorescents utilisés pour une identification des genres bactériens demeurent les anticorps, pour lesquels les protocoles sont nombreux et variés, mais peu sensibles s'ils sont utilisés en direct sur les produits. En effet, la numération
15 d'un petit nombre d'évènements cellulaires dans un aliment est difficile, à cause de la présence d'un bruit de fond important dû à la matrice et à la flore endogène, et au choix du marqueur fluorescent pour obtenir une réelle information sur la viabilité des cellules. Ainsi, il est recommandé de multiplier les marqueurs fluorescents (anticorps, sondes stoechiométriques, intercalants de l'ADN, substrats
20 enzymatiques...) pour discriminer entre une bactérie et des particules fluorescentes entre des espèces de bactéries différentes.

Pour améliorer la détection du genre et de l'espèce bactérienne, la séparation immunomagnétique a été utilisée avec succès pour séparer des microorganismes pathogènes d'une matrice alimentaire complexe. Les sociétés
25 Dynal (Oslo, Norvège) et Vicam (Watertown, USA) commercialisent des billes magnétiques sur lesquelles sont greffés des anticorps qui reconnaissent des bactéries pathogènes. Cependant, des applications conventionnelles nécessitent toujours un étalement sur boîte de Pétri après incubation dans un milieu d'enrichissement sélectif, et parfois des tests de confirmation. Cela réside essentiellement dans le

manque de sélectivité des anticorps utilisés ou des interactions non spécifiques de la flore naturelle avec le support de la bille magnétique (Tomayasu *et al.*, 1998). Par exemple, il est reconnu que des souches de *Vibrio parahaemolyticus* peuvent s'adsorber à la surface des billes magnétiques de manière non-spécifique et que cette

5 capacité d'adsorption est dépendante de l'identité des souches de *Vibrio*. Des améliorations de structure de ces billes paramagnétiques ont consisté à encapsuler la bille dans une structure chimique moins réactive avec le milieu (encapsulated nanobeads, Estapor).

La séparation immuno-magnétique a montré son efficacité à récupérer

10 des cellules eucaryotes à partir de liquides, mais aussi à isoler des microorganismes à partir d'échantillons aussi variés que des aliments, du lait, des fèces (Grant *et al.*, 1998 ; Skjerve *et al.*, 1990, 1991, Pinder *et al.*, 1994 ; Seo *et al.*, 1998) Des billes paramagnétiques présentant à leur surface des anticorps dirigés contre des antigènes de la surface membranaire sont commercialisées. Elles permettent de concentrer des

15 bactéries à partir d'un échantillon complexe, améliorant la sensibilité des techniques utilisées ultérieurement comme la PCR, l'hybridation de sondes nucléiques, l'immunofluorescence et la cytométrie en flux. Cette immuno-concentration réalisée par l'isolement des bactéries fixées aux billes sur la paroi d'un tube permet dans un même temps d'éliminer les agents inhibiteurs présents dans l'échantillon. Elle

20 constitue de plus une phase sélective.

L'utilisation de l'immunofluorescence couplée à la cytométrie en flux répond bien à ce problème de spécificité. Les propriétés immunologiques des bactéries pathogènes des aliments sont connues depuis longtemps et largement utilisées dans des tests de détection rapides. Ces anticorps spécifiques marqués au

25 FITC ont été utilisés pour marquer des Salmonelles ajoutées dans des échantillons de lait et d'oeufs ou dans des eaux de rinçage de carcasses de poulets contaminées (McClelland *et al.*, 1994). Le couplage immunofluorescence et cytométrie en flux a également été appliqué pour détecter *Escherichia coli* O157:H7 dans des

échantillons de viande artificiellement contaminés après destruction de la flore naturelle (Seo *et al.* 1998).

Cependant, dans tous les cas, un pré-traitement de l'échantillon est nécessaire avant l'analyse (traitement chimique ou immuno-séparation) et le seuil de
5 détection ne descend pas en dessous de 10 000 cellules/g de produit, ce qui est trop élevé par rapport aux exigences relatives à la détection des bactéries pathogènes dans les aliments.

Forrest *et al.* 1979 (US 4,141,687) et Ithakissios *et al.* 1978 (US 4,115,534) décrivent la synthèse de particules magnétiques permettant par couplage
10 de molécules de reconnaissance d'extraire par l'application d'un champ magnétique des molécules, des cellules eucaryotes ou procaryotes d'un mélange complexe.

Coulter Electronics (UK 1,561,042) décrit l'utilisation de la cytométrie en flux pour isoler et analyser des particules et des cellules liées à ces particules.

Pinder *et al.* (WO98/20214) ont développé des billes magnétiques de
15 taille inférieure à 1 micron (100 nm étant la taille préférée), qui sont fluorescentes. L'intérêt d'utiliser de telles billes pour extraire et marquer des micro-organismes réside dans leur petitesse. Il n'est pas nécessaire de décrocher lesdites billes des micro-organismes pour pouvoir les détecter par cytométrie en flux.

Pyle *et al.* (WO 95/31481) utilisent des billes magnétiques pour
20 concentrer des bactéries à partir d'un échantillon complexe. Ces bactéries sont alors marquées en vert par un anticorps fluorescent (fluorescéine par exemple) et l'activité respiratoire des cellules est détectée par le CTC (Cyano Tetrazolium Chloride) qui induit une fluorescence rouge chez les cellules, la détection se faisant par microscopie de fluorescence.

25 Senyei *et al.* (EP/0016552) ont greffé sur des billes magnétiques la protéine A (qui peut se lier à de nombreux anticorps) pour ensuite récupérer des cellules ayant à leur surface un anticorps lié.

Vesey *et al.* (WO96/31777) analysent par cytométrie en flux les complexes formés par des billes de latex fixées à des micro-organismes par

l'intermédiaire d'anticorps fluorescents. Ils décrivent l'utilisation d'un anticorps fluorescent pour marquer les micro-organismes qui ont été extraits de l'échantillon par voie immuno-magnétique.

Fortin *et al.* (WO99/47933) utilisent des billes de latex de taille
5 comprise entre 0,08 et 0,5 micron sur lesquelles sont greffés des anticorps reconnaissant des cellules. Il se forme ainsi des complexes observables par cytométrie en flux, selon les caractéristiques de taille et de structure.

La détection de microorganismes dans un échantillon peut également être réalisée par la détection d'activités enzymatiques spécifiques, par l'utilisation de
10 substrats chromogènes ou fluorescents. La revue de Manafi (2000) est une mise à jour assez complète des stratégies utilisées pour identifier les micro-organismes sur la base de la présence ou non d'activités enzymatiques particulières dans le micro-organisme. Les principales clés dichotomiques sont la mise en évidence d'activités estérasiqes particulières (qui n'hydrolysent que des acides gras dont la longueur de
15 la chaîne aliphatique est définie), glycosidiques (hydrolyses de différents sucres), phosphatases et sulfatases. Les substrats utilisés comportent une partie cible, qui est reconnue par l'enzyme recherchée, et une partie marqueur. Cette partie marqueur lorsqu'elle est liée à la cible n'émet de signal visible (chromogène ou fluorescent) qu'après hydrolyse de la liaison marqueur-cible. Les modes de révélation les plus
20 répandus, de ces activités métaboliques sont l'addition de ces substrats dans des milieux de culture. Les substrats, lorsqu'ils sont assimilés par les micro-organismes à l'intérieur d'une colonie, sont responsables d'une coloration de celle-ci. La combinaison des milieux sélectifs et des substrats (un ou plusieurs par milieu) permet d'obtenir une identification précise du micro-organisme recherché, par
25 l'observation de la forme et de la couleur de la bactérie.

Ainsi, pour qu'il y ait coloration d'une colonie sur un milieu chromogène, il faut que le substrat soit expulsé à l'extérieur du microorganisme, à l'intérieur de la colonie.

Schabert *et al.* (WO99/48899) décrivent une voie de synthèse pour un substrat fluorescent (sous excitation UV) permettant de révéler l'activité phosphatyl-inositol spécifique de la phospholipase C. Ce substrat (comportant la 4-méthylumbellifère comme molécule fluorescente) est utilisé dans la conception de deux milieux de culture permettant d'identifier *Listeria monocytogenes* et *Bacillus cereus*. Ce substrat n'est cependant pas assez spécifique d'un genre bactérien pour être utilisé dans le cadre de la présente invention.

Conrad *et al.* (WO00/03034) ont mis au point des substrats fluorescents comportant l'esculine comme molécule fluorescente. Les méthodes de détection et l'utilisation précise de ces substrats pour identifier les microorganismes ne sont pas décrites.

Berg *et al.* (US 5,292,644) décrivent l'utilisation de la 4-méthylumbellifère- β -D-galactosidase, qui est excitable par les UV ($\lambda_{exc}=365$ nm), pour détecter chez les bactéries l'activité galactosidase, que ces microorganismes soient cultivés en milieu liquide ou solide. La détection se fait par excitation de la méthylumbellifère par les U.V.

Nelis *et al.* (WO 98/13515) décrivent l'utilisation de substrats chromogènes ou fluorescents consécutivement à une excitation par les U.V., qui permettent de mettre en évidence les activités bêta-D-galactosidase ou bêta-D-glucuronidase chez les micro-organismes. La technique décrite se limite à la détection desdits microorganismes, marqués sur des milieux de culture solides ou retenus sur un filtre.

Rambach Alain (WO 00/53799) utilise les substrats glucose et phosphate greffés à des molécules chromogènes pour détecter dans un milieu spécifique contenant de la déferoxamine, *Staphylococcus aureus*. La détection repose sur l'observation de composés chromogènes dans la colonie bactérienne, des composés qui sont expulsés par les bactéries à l'intérieur de la colonie. L'identification de *Staphylococcus aureus* est basée sur l'observation de composés chromogènes résultants de l'action des enzymes phosphatase et glucosidase.

Cooke *et al.* (W0 00/41409) marquent spécifiquement les Salmonelles à l'aide d'un substrat chromogène spécifique des activités octanoate-estérases (ou caprylate-estérase) dudit micro-organisme. L'utilisation de l'activité caprylate-estérase comme moyen d'identification de *Salmonella* est décrite depuis de nombreuses années (Humbert *et al.* 1989) et montre peu d'efficacité lorsqu'elle
5 couplée avec des milieux de culture solides. Dans la demande de brevet de Cooke *et al.*, un substrat permettant de détecter la β -D-galactosidase est ajouté au milieu afin d'obtenir une plus grande spécificité.

La présente invention se propose de remédier aux inconvénients de l'art
10 antérieur en proposant un procédé de détection et de numération ou comptage de microorganismes dans un échantillon solide ou liquide dans des conditions de temps et de spécificités nettement améliorées.

Dans le cadre de la présente invention, la recherche de microorganismes peut être réalisée à partir d'échantillons d'origine agroalimentaire, tels que des produits carnés, des ovo produits, des eaux, des produits laitiers y compris le lait,
15 des jus de fruits, des produits végétaux et de leurs dérivés, ainsi qu'à partir d'échantillons d'origine animale y compris humaine, tels que tout type de tissu, des fèces et du sang.

Le procédé de l'invention comprend notamment trois étapes sélectives et
20 spécifiques du microorganisme recherché dans un échantillon, à savoir : l'enrichissement sélectif du microorganisme en question, l'activation dudit microorganisme dans un milieu conditionnant et le marquage fluorescent dudit microorganisme.

En fait, le procédé de détection et de numération ou de comptage de
25 microorganismes dans un échantillon conforme à l'invention, comprend 5 étapes dont certaines peuvent être concomitantes et dont l'ordre peut varier en fonction du microorganisme recherché.

Le procédé de détection conforme à l'invention comprend les étapes de :

- a) enrichissement sélectif du microorganisme recherché dans l'échantillon,
- b) conditionnement dudit microorganisme,
- c) concentration immunomagnétique du microorganisme conditionné,
- 5 d) marquage fluorescent du microorganisme concentré, et
- e) détection et analyse de la fluorescence.

L'un des objectifs de la présente invention est de palier le manque de sensibilité et de spécificité des méthodes de détection de microorganismes de l'art antérieur et le procédé conforme à l'invention permet d'obtenir des seuils de
10 détection très faibles, de l'ordre de 10 à 100 microorganismes/g d'échantillon, c'est-à-dire des seuils 100 à 1 000 fois plus faibles que ceux de l'art antérieur.

Un autre objectif de l'invention est de permettre une détection des microorganismes en moins de 24 heures, ce qui est notamment obtenu par une étape d'enrichissement et de conditionnement du microorganisme recherché en moins de
15 18 heures, un marquage fluorescent en moins de 3 heures, et une détection par cytométrie en flux en quelques minutes.

La première étape du procédé conforme à l'invention est une étape d'enrichissement sélectif du microorganisme recherché dans l'échantillon, cette étape ayant un double but. Elle permet non seulement la multiplication dudit
20 microorganisme mais également permet la revivification dudit microorganisme dans le cas où celui-ci est par exemple stressé. Cette étape d'enrichissement est réalisée dans une composition comprenant des nutriments adaptés à la culture du microorganisme recherché sur une durée de 8 à 15 h. Cette composition comprend également des agents chargés de détruire les espèces réactives à l'oxygène et les
25 agents anti-oxydants qui pourraient être présents dans l'échantillon.

Cette composition est également destinée à rendre ou maintenir une certaine viabilité au microorganisme dont le critère de cultivabilité est momentanément perdu pour diverses raisons, suite à un stress quelconque tel qu'un traitement thermique par exemple.

L'intérêt d'une telle démarche est de pouvoir ensuite détecter et compter les microorganismes en question afin de les prendre en compte dans l'analyse de l'échantillon car de tels microorganismes sont susceptibles de se « réveiller » ultérieurement à la faveur d'un événement particulier, tel qu'un changement de
5 température, et devient alors un danger pour la santé du consommateur ou peut donner lieu à une sous-estimation du niveau de contamination ou d'infection dudit échantillon.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la composition mise en œuvre dans l'étape d'enrichissement sélectif du microorganisme recherché dans
10 l'échantillon comprend :

- du pyruvate de sodium à une concentration comprise entre 1 à 20 g/L, de préférence entre 1 à 10 g/L et plus préférentiellement 4 à 6 g/L,
- du thiosulfate de sodium à une concentration comprise entre 0,5 et 5 g/L, de préférence entre 0,5 et 3 g/L et plus préférentiellement encore environ 2 g/L,
- 15 - de la catalase à une concentration comprise entre 500 et 20 000 u/L, de préférence entre 2 000 et 8 000 u/L et plus préférentiellement encore environ 5 000 u/L.

Outre les deux buts que se propose d'atteindre la susdite composition, elle peut également permettre de détruire les flores compétitives du microorganisme
20 recherché si une telle démarche s'impose en fonction de l'échantillon ou dudit microorganisme. Ainsi, la composition conforme à l'invention peut comprendre en outre au moins un agent antimicrobien.

Par agent « antimicrobien » ou « agent sélectif », on entend tout composé capable de détruire ou inhiber les flores compétitives du microorganisme recherché.
25 Il est à souligner que ledit agent antimicrobien ou sélectif peut être un antibiotique.

Bien évidemment, la formulation antimicrobienne ainsi utilisée (comprenant au moins un agent antimicrobien) est spécifique du microorganisme recherché.

En effet, une des étapes ultérieures du procédé conforme à l'invention consiste en la détection d'au moins une activité spécifique du microorganisme recherché par fluorescence et par conséquent, ladite fluorescence doit être limitée à l'activité recherchée.

5 De plus, les agents antimicrobiens peuvent jouer un rôle sur la modification de l'intégrité membranaire des microorganismes ciblés et donc sur des paramètres mesurables comme le potentiel membranaire, le potentiel d'oxydoréduction ou les activités deshydrogénases. Par exemple, les agents antimicrobiens utilisés pour sélectionner des *Listeria* sont composés d'au moins la
10 polymixine B, l'ofloxacine, l'amphotéricine B et la 5-fluorocytosine. Les agents sélectifs de *Salmonella* sont constitués de vert brillant et de sulfapyridine. Les agents sélectifs de *Staphylococcus aureus* comprennent de la glycine, du chlorure de lithium et de la déféroxamine. La sélection des *Escherichia coli* se fait par les sels biliaires. Les agents sélectifs de *Mycobacterium avium paratuberculosis*
15 comprennent de la vancomycine hydrochloride et l'acide nalidixique. Les antibiotiques sélectifs de *Legionella pneumophila* sont constitués du mélange polymixine B, vancomycine, cycloheximide.

Par « conditionnement » du microorganisme recherché dans un échantillon selon le procédé de l'invention, on entend « induction » ou « activation »
20 d'au moins une activité ou propriété spécifique dudit microorganisme. Cette étape est importante et est destinée à permettre la détection de l'activité ou de la propriété spécifique en question par un marquage fluorescent.

Par exemple, le conditionnement du microorganisme recherché peut consister en l'induction d'une activité enzymatique caractéristique du
25 microorganisme recherché et il résulte de l'ajout au milieu d'enrichissement du microorganisme d'un substrat non fluorescent spécifique de ladite enzyme.

Il est à souligner que le conditionnement peut comprendre l'induction d'une ou de plusieurs activité(s) enzymatique(s).

Les substrats non fluorescents spécifiques des enzymes recherchées sont par exemple : l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, le mélibiose- méthyl- β -D-galactopyranoside pour activer la β -D-galactosidase, par exemple le méthyl- α -D-galactopyranoside pour induire l' α -D-galactosidase, le p-nitrophényl- β -D-glucuronide, l'isopropyl- β -D-glucuronide, ou le méthyl- β -D-glucuronide sodium pour induire la glucuronidase, le méthyl- β -D-glucoside, la cellobiose et la salicine pour induire la β -Dglucosidase, le méthyl-caprylate pour induire la caprylate estérase, le 4-nitrophényl-palmitate, le méthyl-palmitate pour induire la palmitate estérase, l'acide 2-méthyl-propionique pour induire la propionate estérase.

10 Selon un mode préférentiel de mise en œuvre de la présente invention et dans le cas où le conditionnement consiste en l'induction d'au moins une activité enzymatique spécifique du microorganisme recherché, les étapes a) et b) du procédé de l'invention peuvent être réalisées simultanément. La sensibilité et la rapidité de l'analyse peuvent s'en trouver améliorées. Dans ce cas, la durée totale de ces deux
15 phases réalisées simultanément est comprise entre 6 h et 48 h, de préférence 12 h et 24 h et plus préférentiellement encore entre 15 et 18 h.

Dans le cas où le microorganisme recherché dans l'échantillon est une bactérie Gram⁺, l'étape de conditionnement peut également comprendre une étape d'induction d'au moins un antigène de surface caractéristique ou spécifique dudit
20 microorganisme comprenant l'ajout au milieu d'enrichissement du microorganisme d'un extrait de levure à une concentration comprise entre 5 et 50 g/L, de préférence entre 10 et 20 g/L et plus préférentiellement encore environ 10 g/L.

L'induction d'au moins un antigène de surface, dans le cas où le microorganisme recherché est une bactérie Gram⁺, en plus de l'induction
25 enzymatique, s'explique par le fait qu'il est impossible, selon l'art antérieur, de réaliser un tri immunomagnétique à l'aide d'anticorps dirigés contre des antigènes de la membrane et de la paroi cellulaire. Sous des conditions classiques de culture, les bactéries à Gram⁺ synthétisent une capsule exopolysaccharidique pour se protéger
d'une agression extérieure, ce qui masque les antigènes de la paroi cellulaire et de la

membrane, les rendant inaccessibles à des anticorps. C'est la raison pour laquelle, selon un mode préférentiel de mise en œuvre de la présente invention, l'inhibition de la synthèse de cette capsule est réalisée par l'ajout au milieu d'enrichissement d'un extrait de levure, activant ainsi l'expression d'antigènes de membrane et de la paroi
5 rendus ainsi accessibles à des anticorps.

L'étape de concentration immunomagnétique du microorganisme recherché est réalisée à partir du milieu de conditionnement. La concentration immunomagnétique consiste, par le biais d'une réaction antigène-anticorps, à concentrer ledit microorganisme à partir du milieu de conditionnement.

10 L'anticorps mis en contact avec le microorganisme recherché est dirigé vers un antigène spécifique dudit microorganisme tout en étant greffé sur une bille magnétique. Ensuite, les complexes billes-anticorps-microorganismes sont séparés du milieu et le microorganisme est ensuite séparé du reste du complexe.

Cette étape de concentration immunomagnétique peut être réalisée avec
15 les billes Dynabeads® selon les recommandations du fournisseur, à l'exception du volume d'échantillon qui est doublé. La réaction peut également être réalisée avec les billes liées de façon covalente à des anticorps (secondaires) dirigés contre les anticorps (primaires) de lapin (Dynabeads MP-280 sheep anti-rabbit IgG).

A titre d'exemple, le protocole mis en œuvre peut être le suivant : un
20 volume de 1 à 50 ml d'échantillon, de préférence 1 à 5 ml, préférentiellement 2 ml, est mis en contact pendant 30 min à température ambiante avec 1 à 250 µg, de préférence 1 à 50 µg, préférentiellement de 10 µg d'anticorps dirigé contre la bactérie recherchée. Une quantité de billes Dynabeads (*Listeria*, *Salmonella*...) comprise entre 1.10^6 et 250.10^6 , de préférence entre 10.10^6 et 20.10^6 ,
25 préférentiellement 10.10^6 , lavées en PBS (14190-094, Invitrogen S.a.r.l) / BSA (ID-BIO Sa) 0,1% au préalable, est ajoutée et l'ensemble est incubé 30 min à température ambiante sous agitation douce et régulière. A l'aide d'un concentrateur de particules magnétique (MPC-E, Dynal Biotech SA ou tout autre appareil de tri magnétique), les billes sont récupérées sur la paroi des microtubes par élimination

du liquide résiduel. Elles sont ensuite lavées dans un volume de PBS et récupérées à nouveau à l'aide du concentrateur de particules.

A l'issue de la réaction d'immuno-concentration, les billes sont reprises dans 225 µl de PBS. Les bactéries sont ensuite décrochées des billes. Le
5 concentrateur magnétique sert ensuite à éliminer les billes et le surnageant de décrochage contenant les bactéries concentrées est récupéré dans un tube de 5 ml pour subir la réaction de marquage fluorescent.

L'étape d'immuno-concentration, outre le fait de concentrer les bactéries d'intérêt et donc d'augmenter d'un facteur 10 la sensibilité de détection, permet
10 d'éliminer les bactéries ayant pu se développer dans le milieu d'enrichissement et/ou conditionnement malgré les éléments sélectifs.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'anticorps greffé sur la bille magnétique est dirigé contre un anticorps lui-même dirigé contre un antigène spécifique du microorganisme recherché. En d'autres termes, une première réaction
15 antigène-anticorps est réalisée par la mise en contact du microorganisme recherché avec un anticorps dit « primaire » dirigé contre un antigène spécifique de ce microorganisme et une seconde réaction antigène-anticorps est réalisée par la mise en contact de l'anticorps « primaire » avec un anticorps dit « secondaire » greffé sur une bille magnétique et dirigé contre ledit anticorps primaire.

20 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, les billes magnétiques présentent un diamètre compris entre 1 et 20 µm, de préférence entre 2 et 8 µm. Plus préférentiellement encore, les billes mises en œuvre dans les exemples ont, comme indiqué, un diamètre de 2,8 µm ou 4,5 µm.

La taille des billes mise en œuvre dans la présente invention est
25 importante car elle doit permettre l'extraction des bactéries de milieux complexes avec une grande efficacité. Dans l'art antérieur, des billes présentant un diamètre très inférieur à celui des billes de l'invention ont été utilisées (nanobilles) mais les Inventeurs ont constaté que celles-ci donnaient lieu à un bruit de fond beaucoup trop

important ne permettant pas clairement de distinguer les microorganismes des autres éléments du milieu.

Le marquage fluorescent des microorganismes recherchés, de préférence obtenus après concentration immunomagnétique, est réalisé par l'ajout au milieu
5 contenant lesdits microorganismes d'au moins un substrat comprenant une partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler et une partie marqueur.

Par le choix de ces substrats, selon qu'il y ait utilisation ou non par le microorganisme, il est possible de différencier et de caractériser des espèces ou sous espèces d'un genre microbien donné.

10 Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, la partie marqueur est constituée par un marqueur fluorogène excité à 488 nm, pouvant être constitué par l'un des constituants suivants : la fluorescéine, la phycoérythrine, la cyanine et l'esculine. Dans le cas où plusieurs substrats sont mis en œuvre, chacun d'eux peut comprendre une partie marqueur différente de la ou des autres partie(s) marqueur, de
15 façon par exemple à exprimer plusieurs couleurs de fluorescence.

Dans le cadre de la présente invention, il est important que la transformation du substrat ait lieu à l'intérieur de la bactérie de façon à ce que le produit fluorescent reste à l'intérieur de celle-ci. Le marqueur fluorogène doit donc être retenu dans la cellule.

20 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la partie du substrat spécifique de l'activité enzymatique à révéler est constituée d'un acide gras, d'un ose, d'un phosphate, d'un sulfate.

Les acides gras sont caractérisés par une chaîne carbonnée de longueur comprise entre 2 et 20 atomes de carbones. Préférentiellement, le substrat est choisi
25 dans le groupe comprenant la fluorescéine-di-caprylate, la fluorescéine-di-palmitate, la fluorescéine-di-dibutyrate, la fluorescéine-di-dicaproate, la fluorescéine-di-dilaurate, la fluorescéine-di-propionate, la 5(6)-carboxy-dichloro-fluorescéine-diacétate.

Les oses sont des pentoses ou des acides glucuroniques. Préférentiellement, le substrat est choisi dans le groupe comprenant la fluorescéine-di- β -D-galactopyranoside, le fluorescéine- α -D-galactopyranoside, la fluorescéine-di- β -D-glucopyranoside, le fluorescéine-di- β -D-mannopyranoside, le fluorescéine-di- β -
5 D-fucopyranoside, le fluorescéine-di- β -D-N-acétylgalactosaminide, le fluorescéine-di- β -D-N-acétylglucosaminide, le fluorescéine-di- β -D-xyloside.

Préférentiellement, les substrats phosphate et sulfate sont la fluorescéine-diphosphate et la fluorescéine-disulfate respectivement.

Préférentiellement, les substrats fluorescents permettant de détecter les
10 activités estérases, osidases, phosphatases, ou sulfatases sont ajoutés aux milieux de conditionnement à une concentration comprise entre 0,1 μ M et 1 mM, de préférence 1 μ M à 100 μ M.

A titre d'exemple, les substrats suivants sont particulièrement intéressants :

15 - le 5,6-carboxy-dichloro-fluorescéine-diacétate pour révéler la forte activité estérasique de *Listeria monocytogenes*, et les conditions acides du contenu intracellulaire de cette bactérie ;

- le fluorescéine-di-bêta-D-glucopyranoside pour révéler l'activité bêta-D-glucoside de *Listeria monocytogenes*, ladite activité étant amplifiée chez *Listeria*
20 *monocytogenes* par l'adjonction du substrat salicine préférentiellement dans le milieu de conditionnement à la concentration de 1 à 10 mM ;

- la fluorescéine-dipropionate pour révéler l'activité propionate estérase de *Listeria monocytogenes* ; l'induction de cette enzyme est réalisée par l'ajout de l'acide 2-méthyl-propionique préférentiellement dans le milieu de conditionnement à
25 la concentration de 1 à 10 mM ;

- la fluorescéine di-phosphate comme révélateur de l'activité phosphatase alcaline chez *Staphylococcus aureus*, une répression de l'enzyme chez les *Staphylococcus* non-aureus peut être réalisée par l'ajout de phosphate inorganique à 0,3% dans le milieu de conditionnement ;

- l'acide fluorescéine-di-bêta-D-glucuronique comme révélateur de la glucuronidase chez *Escherichia coli* ; une induction de l'enzyme chez le micro-organisme est réalisée par l'ajout de 4-nitrophényl-bêta-D-glucuronide de 1 à 10 mM dans le milieu de conditionnement ;

5 - la fluorescéine-di-palmitate comme révélateur de la palmitate estérase chez *Mycobacterium avium paratuberculosis*, une induction de l'enzyme chez le micro-organisme est réalisée par l'ajout de 4-nitrophényl palmitate ou méthyl-palmitate de 1 à 10 mM dans le milieu de conditionnement ;

10 - la fluorescéine-di-caprylate comme révélateur de la caprylate estérase chez *Salmonella*, une induction de l'enzyme chez le microorganisme est réalisée par l'ajout de méthyl-caprylate de 1 à 10 mM dans le milieu de conditionnement.

15 Les réactions enzymatiques peuvent se produire dans une gamme de température variant de 25 à 45°C selon les microorganismes, à l'abri de la lumière et pour une durée n'excédant pas 1 h. Sitôt la réaction de marquage achevée, les microorganismes sont stockés à 4°C pour limiter leur développement et surtout empêcher l'efflux de marqueur à l'extérieur du microorganisme.

20 Par ailleurs, il est intéressant de souligner que lorsque l'étape de conditionnement du procédé conforme à l'invention consiste en une étape d'induction d'au moins une activité enzymatique spécifique du microorganisme recherché, l'étape de concentration immunomagnétique peut avoir lieu avant l'étape de conditionnement du microorganisme en question, ou après l'étape de marquage fluorescent du microorganisme.

25 En d'autres termes, l'étape de conditionnement du microorganisme recherché peut avoir lieu dans un milieu comprenant ledit microorganisme préalablement concentré de façon immunomagnétique, et donc l'étape de marquage fluorescent interviendra après l'étape de conditionnement ; mais il est également possible d'envisager que l'étape de marquage fluorescent du microorganisme intervienne immédiatement après l'étape de conditionnement et que la concentration

immunomagnétique du microorganisme n'intervienne qu'après ledit marquage fluorescent.

Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, la détection et l'analyse de la fluorescence permettant la numération ou le comptage des microorganismes recherchés est réalisée par une technique choisie dans le groupe
5 comprenant : la cytométrie en flux, la cytométrie sur filtre et la microscopie de fluorescence, la cytométrie en flux étant préférée.

La cytométrie en flux s'est en fait avérée particulièrement intéressante, en tant que dernière étape du procédé conforme à l'invention, afin de pouvoir rendre
10 un résultat d'analyse fiable et rapide, c'est-à-dire en 24 h, voire 12 h.

La cytométrie en flux a connu récemment, en microbiologie, plusieurs développements : le dénombrement des microorganismes totaux en utilisant des marqueurs cellulaires non spécifiques, la détection et l'identification de microorganismes à l'aide de marqueurs spécifiques (immunoglobulines ou
15 marqueurs génétiques) couplés à des fluorochromes (Robinson J. P., 1999).

De plus, cette technique s'applique parfaitement bien aux différents types d'échantillons mentionnés ci-dessus mais trouve également des applications dans le diagnostic vétérinaire et les analyses environnementales.

Chez l'animal contaminé par des microorganismes pathogènes, la
20 présence de ces derniers peut être révélée de manière directe, ou indirecte. La voie directe consiste à détecter dans des biopsies ou des tissus, lesdits microorganismes par culture dans un milieu adapté (boîte de Pétri) ou à détecter par des méthodes ELISA des antigènes microbiens ou la recherche de séquences cibles dans l'ADN. La voie indirecte consiste en la détection des anticorps dirigés contre les antigènes
25 microbiens qui sont produits en réponse à l'infection de l'animal par ces microorganismes. Le but est de diagnostiquer le plus précocement possible l'état sanitaire d'un animal, pour éviter que celui-ci ne contamine le reste du troupeau. Les méthodes d'analyses doivent donc être rapides et précoces dans le stade de développement de la maladie. Ainsi, il faut améliorer la détection des bactéries qui

poussent très lentement dans un milieu de culture (exemple des mycobactéries) ou dont la propagation dans un cheptel est très rapide et passe parfois inaperçue au cours de ce que l'on appelle une phase asymptomatique (paratuberculose et maladie des muqueuses bovines).

5 Comme précédemment indiqué, les échantillons susceptibles d'être analysés par le procédé conforme à l'invention peuvent être d'origines très diverses mais également de consistance et/ou de nature très diverses. Ainsi, les caractéristiques physiques dudit échantillon peuvent nécessiter une étape préalable aux étapes a), b), c), d) et e) du procédé de l'invention. Plus particulièrement, il
10 s'agit d'une étape de filtration de l'échantillon à analyser.

Dans le cas par exemple où l'échantillon à analyser est un échantillon solide, semi-solide ou constitué d'un liquide trouble, ladite filtration, appelée également broyage, est réalisée au moyen d'un filtre dont la porosité est comprise entre 20 et 150 microns, de préférence entre 30 et 100 microns et plus
15 préférentiellement encore d'environ 63 microns.

A titre d'exemple, la filtration des échantillons solides peut être réalisée dans un sac plastique dans lequel est inséré sur toute sa surface un filtre pleine page en plastique présentant la porosité ci-dessus mentionnée.

Dans le cas où l'échantillon à analyser par le procédé conforme à
20 l'invention est constitué d'un liquide clair, il peut être filtré sur une membrane présentant une porosité comprise entre 0,2 et 10 μm , de préférence 0,2 et 5 μm et plus préférentiellement encore entre 0,2 et 0,5 μm .

La présente invention concerne également un milieu d'enrichissement sélectif d'un microorganisme recherché dans un échantillon comprenant une
25 composition nutritive permettant la multiplication dudit microorganisme, une composition de revivification dudit microorganisme, et éventuellement une composition de destruction des flores compétitives dudit microorganisme.

Selon un mode de réalisation préférée de l'invention, le milieu d'enrichissement comprend :

- du pyruvate de sodium à une concentration comprise entre 1 à 20 g/L, de préférence entre 1 à 10 g/L et plus préférentiellement entre 4 à 6 g/L,
- 5 - du thiosulfate de sodium à une concentration comprise entre 0,5 et 5 g/L, de préférence entre 0,5 et 3 g/L et plus préférentiellement encore environ 2 g/L,
- de la catalase à une concentration comprise entre 500 et 20 000 u/L, de préférence entre 2 000 et 8 000 u/L et plus préférentiellement encore environ 5 000 u/L.

10 Le susdit milieu d'enrichissement du microorganisme recherché dans l'échantillon à analyser peut en outre comprendre au moins un antibiotique.

La présente description sera mieux comprise à la lumière des exemples ci-après. Ces exemples ne précisent ni la nature, ni l'origine de l'échantillon à analyser. Ils identifient le microorganisme recherché et illustrent la détection de ce
15 microorganisme, étant entendu que le protocole décrit est le même quelque soit la nature ou l'origine de l'échantillon. Seule l'étape de broyage ou de filtration de l'échantillon, préalablement à l'étape d'enrichissement, n'est pas décrite.

EXEMPLES

20 Exemple 1 : Détection de *Listeria monocytogenes*

Procédure pour activer l'enzyme bêta-D-glucosidase et les antigènes de surface flagellaires 1 et 4 de *Listeria monocytogenes*, et détection par cytométrie.

25 *Listeria monocytogenes* est un bacille Gram positif, catalase+, oxydase-, non sporulé, non encapsulé, pathogène pour l'homme chez qui il est responsable de la listériose, maladie pouvant provoquer des avortements, des septicémies et des méningo-encéphalites.

Il fait partie du genre des *Listeria* qui comprend 6 espèces

(*monocytogenes*, *ivanovii*, *innocua*, *welshimeri*, *seeligeri* et *grayi*). Les souches de

Listeria monocytogenes sont divisées en 17 sérotypes basés sur les antigènes somatiques (de 1 à 15) et flagellaires (de A à E) dont 3 (1/2a, 1/2b et 4b) représentent 95 % des souches isolées et sont responsables des listérioses humaines (Swaminathan *et al.*, 1995).

5 Les caractéristiques de survie et de multiplication de cette bactérie expliquent sa large répartition. Elle peut se multiplier en l'absence d'oxygène, à des pH pouvant aller de 5,6 à 9,6 et à des températures comprises entre 1 et 45 °C; elle résiste au sel (jusqu'à 20 % pour certaines souches), au dessèchement et à la congélation. Enfin, elle peut former ou participer à des biofilms favorisant sa
10 persistance malgré le nettoyage et la désinfection.

Capable de persister dans des conditions hostiles pour la plupart des autres germes, elle est cependant assez peu compétitive et est inhibée par les flores microbiennes complexes. Dans les matrices alimentaires, les *Listeria monocytogenes* sont parfois en très faible nombre associées à une flore complexe composée souvent
15 de streptocoques, entérocoques, microcoques, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris* (Kramer et Jones, 1969).

La transmission des *Listeria* se fait essentiellement par des aliments contaminés. La dose infectante à l'origine de cas cliniques est supérieure à 100 germes par g ou par ml.

20 L'enzyme β -D-glucosidase est présente chez toutes les espèces de *Listeria*, mais seule l'espèce *monocytogenes* possède la phosphatidylinositol phospholipase C (Notermans *et al.*, 1991). L'activité phosphatidylinositol phospholipase C est aussi retrouvée chez d'autres espèces microbiennes comme *Bacillus*.

25 Les caractéristiques des *Listeria monocytogenes* concernant la croissance, la sérologie et la biochimie sont à l'origine de la définition du milieu d'enrichissement utilisé pour revivifier et multiplier les *Listeria monocytogenes* à partir d'échantillons complexes tout en inhibant les bactéries compétitives, pour stimuler la production des antigènes somatiques 1 et 4 et pour induire l'expression

de l'enzyme β -D-glucosidase qui servira à la détection des bactéries par l'utilisation d'un substrat fluorescent.

Le bouillon sélectif utilisé couramment pour *Listeria* est le Fraser 1/2. La composition de ce milieu a servi de base pour notre bouillon en ce qui concerne la base d'enrichissement non sélective. A cette base est ajoutée un supplément de revivification qui permettent de combler une carence du Fraser 1/2 : mettre en évidence des bactéries stressées. D'autre part un supplément d'induction d'activité β -D-glucosidase est ajouté. Le supplément sélectif du Fraser 1/2 a été modifié pour être efficace sur l'ensemble des produits complexes sur lesquels nous avons effectué la procédure complète de détection des *Listeria monocytogenes*.

Une autre réalisation particulière pour *Listeria monocytogenes* consiste à activer l'enzyme propionate estérase par l'ajout d'acide propionique à 2 mM dans le milieu de conditionnement. Cette activité est absente chez les entérocoques, ou autres coques à Gram positif, qui peuvent se développer de manière non spécifique dans le bouillon.

1) Compositions

a. Base d'enrichissement non sélectif.

Tryptone peptone 5 à 15 g/L, concentration préférée 10g/L, , Extrait de levure 5 à 15 g/L, concentration préférée 10g/L, Na_2HPO_4 9,6 g/L, KH_2PO_4 1,35 g/L, NaCl 10 à 30 g/L, concentration préférée 20g/L.

La tryptone peptone et l'extrait de levure sont la source d'azote, de carbone, de vitamines et de minéraux. Ils permettent la production des antigènes. Les sels de Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 permettent d'ajuster le pH du milieu à 7 +/- 0,2, pH de croissance optimum pour listéria et de tamponner le milieu au cours de l'enrichissement. La forte concentration en NaCl a pour but d'inhiber les entérocoques, flore souvent associée aux listéria qui présentent des caractéristiques communes avec elles notamment l'activité β -D-glucosidase.

b. Supplément de revivification.

Pyruvate de Na 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L, Thioglycolate de Na, 0,5 à 5 g/L, concentration préférée 2,5 g/L, Catalase 5 000 u/L

Le pyruvate et le thioglycolate de Na est ajouté pour participer à la stimulation du métabolisme des organismes stressés. La catalase intervient dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour les microorganismes et potentiellement présents dans les aliments.

c. Complément d'induction de l'activité β -D-glucosidase.

Salicine de 1 à 20 mM, de préférence 2 mM.

A l'image de certaines β -D-glucosidases de champignons (Birk *et al.*, 1997 ; Perez-Pons J.A. 1995 ; Venturi *et al.* 2002) ou de bactéries (Yang *et al.*, 1996), la β -D-glucosidase de *Listeria monocytogenes* est inductible. En absence d'inducteur pendant la phase d'enrichissement l'activité enzymatique est indétectable.

La salicine est un substrat de la β -D-glucosidase ; sa présence dans le bouillon d'enrichissement permet l'induction de l'expression de cette enzyme et sa détection par cytométrie en flux. (cellobiose ou méthyl- β -Dglucoside peuvent également être utilisés).

d. Complément d'induction de l'activité propionate estérase

Acide 2-méthyl-propionique, de 1 à 20 mM, concentration préférée 2 mM.

La présence de l'acide 2-méthyl-propionique dans le bouillon de conditionnement permet d'induire l'activité propionate estérase de *Listeria monocytogenes*, en vue de sa détection par un marquage fluorescent et cytométrie en flux.

e. Complément sélectif.

Polymixine B 5mg/L, Ofloxacin 1mg/L, Amphotéricine B 2 mg/L, 5-Fluorocytosine 4 mg/L.

La polymixine B est un antibiotique bactéricide actif sur les bactéries Gram négatif, agissant notamment sur *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'ofloxacin complète l'action de la polymixine B sur les bactéries Gram négatif avec une activité bactéricide entre autre sur *Proteus vulgaris*. Dans le Fraser 1/2, c'est le chlorure de lithium associé à l'acide nalidixique qui inhibent les bactéries à Gram négatif; ils n'ont aucun effet sur *Pseudomonas* et *Proteus*. L'activité de l'ofloxacin s'étend également sur certaines espèces de streptocoques et staphylocoques. L'amphotéricine B est fongistatique ou fongicide selon les souches et la 5-fluorocytosine est fongicide. Il n'y a pas de fongicide dans la composition du Fraser 1/2. Certains produits, notamment les saucisses chipolatas sont chargées en levures qui interfèrent dans la réaction de détection par la beta-D-glucosidase. L'acriflavine inhibant les coques Gram positif n'est pas ajouté dans le milieu de conditionnement, car il rend les éléments du milieu fluorescents ce qui donne un bruit de fond sur les cytoigrammes interférant dans la lecture de ceux-ci. Les coques les plus gênantes pour notre procédure sont celles qui possèdent l'activité β -D-glucosidase, ce sont les entérocoques dont la pousse est inhibée par la forte concentration en NaCl du bouillon. L'élimination des faux positifs résultant du marquage de l'activité glucosidase dans les coques à Gram positif peut se faire par une révélation de l'activité propionate-estérase qui est absente chez les coques et activable chez *Listeria monocytogenes*.

L'échantillon est dilué dans le bouillon sans le supplément sélectif à raison d'un facteur 5 à 10 (p/p). La température d'incubation à utiliser est de 30°C et le temps d'incubation de 12h. Au bout de 4h de revivification, le supplément sélectif est ajouté, suit la phase d'enrichissement sélectif de 8 h à 30°C.

25

2) Immunoconcentration

La réaction est réalisée avec des billes magnétiques (par exemple les Dynabeads®-Listeria Dynal Biotech, diamètre de 2,8 μ m) selon les recommandations du fournisseur, mais cet anticorps n'est pas spécifique de l'espèce *monocytogenes*.

Différents anticorps peuvent être utilisés sur les billes :

- un anticorps spécifique « *Listeria* O antiserum poly Serotypes 1,4 » (référence 223021, BD Diagnostics Systems) spécifique des souches de *Listeria monocytogenes* responsables des listérioses humaines et qui expriment les antigènes de type 1 et 4,

- un sérum spécifique de *Listeria monocytogenes* développé en inoculant des bactéries inactivées à un lapin, lesdites bactéries ayant au préalable été cultivées dans le bouillon de conditionnement.

Cette étape peut être réalisée indirectement avec une première réaction en présence d'un anticorps primaire (un des deux cités ci-dessus) non greffé sur des billes puis une immunoconcentration réalisée avec des billes recouvertes d'un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire (par exemple Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit IgG, diamètre 2,8 µm, référence 112-01, Dynal Biotech).

3) Marquage enzymatique

a. Détection d'une activité estérasique.

Le substrat 5,6-carboxy-dichloro-fluorescéine-diacétate (référence 21884, Fluka Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l) est préparé dans du diméthyl formamide à la concentration de 10 mM, puis dilué à 10 µM dans du PBS. La réaction de marquage se fait avec 25 µl de la dilution ajoutés au surnageant de décrochage de l'immunoconcentration pendant 15 min à 37°C. Au cours de la réaction, la 5(6)-carboxy-dichloro-fluoresceine est libérée dans le microorganisme et devient fluorescente. Cette molécule a la particularité d'émettre une fluorescence verte dans des gammes de pH acide (Nedergaard *et al.*, 1990).

Ce marqueur présente une spécificité vis à vis de *Listeria monocytogenes* par rapport à de nombreuses souches lorsqu'il est utilisé à la concentration de 1 µM finale (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus sp.*, *Yersinia alvei*). Il s'agit sans doute d'une particularité de cette bactérie, liée au fait qu'elle possède une activité estérase plus forte que pour

les autres espèces de *Listeria* ; particularité qui se double d'un pH intracellulaire plus acide (nos observations). S'il est choisi pour faire la détection des *Listeria* par cytométrie en flux, la salicine n'est pas utile pour le milieu d'enrichissement.

b. Détection de l'activité β -D-glucosidase.

5 Le substrat fluorescéine di- β -D-glucopyranoside est préparé à 20 mM dans un mélange H₂O/DMSO/éthanol 8 : 1 : 1 selon la procédure recommandée par Molecular probes pour la Fluorescein-di- β -D-galactoside. Il est dilué à 4 mM dans H₂O avant utilisation à 500 μ M final.

10 Les bactéries récupérées par immunoconcentration sont perméabilisées par addition de 15 μ l d'isopropanol suivie d'une courte incubation de 5 minutes à 37°C avant l'addition du substrat. La réaction enzymatique est effectuée à 37°C pendant 1 h, puis placée à 4°C immédiatement.

c. Détection de l'activité propionate estérase.

15 Le substrat fluorescéine-dipropionate est préparé à une concentration de 10 mM dans du DMSO 10mM. Il est ajouté à l'échantillon de manière à ce que la concentration finale du substrat soit 100 μ M finale. L'échantillon est alors incubé 15 min à 37°C, puis placé à 4 °C immédiatement dans l'attente de l'analyse.

Exemple 2 : Détection de *Salmonella*.

20 **Procédure pour activer l'enzyme caprylate estérase, l'expression des antigènes de surface de *Salmonella*, et détection par cytométrie.**

Daniel E. Salmon, vétérinaire aux Etats-Unis, a découvert la première souche de salmonelle en 1885. On en connaît aujourd'hui 2 213 et la liste n'est pas close. Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatifs anaérobies facultatifs, 25 (oxydase (-), catalase (+), asporulés), qui réduisent les nitrites en nitrates et fermentent le glucose. Le genre *Salmonella* comprend plus de 2500 sérotypes dont une cinquantaine sont vraiment importants dans nos régions. La formule antigénique est basée sur la nature des antigènes somatiques O, flagellaires H, ou capsulaire K (l'antigène Vi). Cet antigène capsulaire masque l'antigène O et est révélé après

chauffage. Les antigènes O correspondent au lipopolysaccharide du LPS. Certaines souches peuvent perdre tout ou partie de ce pouvoir antigénique : formes R ou T. L'antigène H est soumis à un phénomène de variation de phase : il peut se trouver sous deux formes dénommées 1 et 2.

5 Première cause de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), la salmonellose représente à elle seule environ les 2/3 des TIAC. Ces dernières années ont vu une augmentation spectaculaire, en incidence et en gravité, des cas de salmonelloses humaines. Par rapport à 1980, certains pays ont connu une multiplication de l'incidence par 20 sur les dix ou quinze dernières années. Lorsqu'on
10 a étudié de manière plus approfondie les épidémies, on a découvert que la majorité des cas avaient pour origine des souches, ou plus exactement des sérotypes de *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*. La situation s'est encore aggravée depuis le début des années 1990 : des souches de *S. typhimurium*, résistantes à de nombreux antibiotiques, sont apparues et sont susceptibles de devenir un grave
15 problème de santé publique.

L'être humain contracte surtout les salmonelloses en consommant de la nourriture contaminée d'origine animale, crue ou pas assez cuite (principalement de la viande, des volailles, des oeufs et du lait), bien qu'un grand nombre d'autres aliments aient été impliqués dans la transmission. L'agent causal passe dans la
20 chaîne alimentaire à partir de la production primaire ou lors d'une contamination croisée avec des aliments à domicile ou dans des services de restauration collective ou des institutions comme les hôpitaux. La bactérie se multiplie encore à + 5°C/+ 12°C voire à une température inférieure à + 5°C. Elle survit bien à la congélation, la salaison et la déshydratation.

25 La transmission de personne à personne est rare dans les pays développés mais se produit parfois, notamment dans les institutions comme les services de soins néonataux ou les résidences pour personnes âgées.

Sur le plan épidémiologique, sont classés en fonction de leur adaptation à l'hôte humain ou animal et les antigènes somatiques O, trois groupes de salmonelles :

- le groupe B (51,8 % des cas), par exemple *Salmonella typhimurium* et
5 *Salmonella paratyphi B*, provoque des fièvres entériques uniquement chez l'être humain et les primates supérieurs. Il se caractérise par des souches qui expriment l'antigène somatique 4 systématiquement et les antigènes 1, 5, 12 et 27 selon les sous-espèces concernées,
- le groupe D (19,1 % des cas) donne des maladies chez certains
10 animaux, *Salmonella dublin* chez les bovidés, *Salmonella cholerae-suis* chez le porc et *Salmonella enteritidis*, mais rarement chez l'homme. Toutefois, lorsque l'affection touche l'être humain, elle prend souvent un caractère invasif et peut être mortelle. Les salmonelles composant ce groupe expriment toujours l'antigène 9 et selon les sous-espèces les antigènes 1 et 12,
- 15 - les bactéries du groupe C (20, 3 % des cas) expriment les antigènes 6,7 ; 6,8 ou 8, celles du groupe E (6,2 % des cas) les antigènes 3,10 ; 3,15 ; 1,3,19 ; celle du groupe G (1,2 %) les antigènes (13,22 ; 13,23) ; celles du groupe K l'antigène 18 et celle du groupe A (0,24 % des cas) *Salmonella paratyphi A* les antigènes 1,2.
- 20 La dose infectante de Salmonelles est de l'ordre de 100 000 germes. Les symptômes consécutifs à l'ingestion d'une telle dose sont des fièvres typhoïdes, lorsque les serovars incriminés sont *Salmonella typhi* et *paratyphi A*, B et C (House et al. 2001). Après une durée d'incubation variable de 1 à 25 jours, la maladie se déclenche avec des syndromes digestifs (diarrhées, douleurs abdominales,
25 vomissements) avant d'entrer dans une phase septicémique lymphatique avec fièvre et torpeur. Cette manifestation est due à l'action au niveau cérébral d'une endotoxine neurotrope, le LipoPolySaccharide (LPS). Des sérovars moins pathogènes comme *Salmonella enteritidis*, *typhimurium*, *cholerae suis*, *dublin* etc..

sont eux responsables de toxi-infections alimentaires moins sévères que l'on appelle salmonelloses.

Les entérobactéries pathogènes dont fait partie *Salmonella*, peuvent être recherchées directement sur des milieux sélectifs qui inhibent la croissance des bactéries Gram (+) et partiellement des coliformes, de *Proteus* et autres Gram (-). Ces milieux contiennent pour cela des extraits de bile, de désoxycholate de citrate, de sulfate ou de vert brillant en combinaisons diverses.

Le test de la β -galactosidase permet de distinguer entre les souches de salmonelles (β -Gal -) et celles de *Shigella* (β -Gal +). Ces deux germes bactériens possédant des conditions de culture très proches, sont fréquemment rencontrés conjointement. Une caractéristique particulière de *Salmonella* est sa capacité à métaboliser l'acide caprylique (activité C8 estérase). La mesure de l'activité caprylate estérase est utilisée dans un test utilisant la 4-méthylumbelliférone qui fluoresce lorsqu'elle est excitée par des UV (Humbert *et al.*, 1989 ; Olsson *et al.* 1991). Certains milieux de culture utilisent une combinaison de 2 substrats chromogènes car les Salmonelles sont β -galactosidase négatives et glucuronate positives (milieux de culture SMID).

1) Compositions

a. Base d'enrichissement non sélectif.

Tryptone peptone 5 à 15 g/L, concentration préférée 10 g/L, NaCl, 10 à 30 g/L, concentration préférée 20 g/L, Extrait de levure 5 à 15 g/L, concentration préférée 10 g/L, D-Glucose 0,5 à 3 g/L, concentration préférée 1 g/L, Na_2HPO_4 5 à 15 g/L, concentration préférée 9,6 g/L, KH_2PO_4 0,5 à 3 g/L, concentration préférée 1,35 g/L.

La tryptone peptone et l'extrait de levure sont la source d'azote, de carbone, de vitamines et de minéraux. Ils permettent la production des antigènes. Les sels de Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 permettent d'ajuster le pH du milieu à $7 \pm 0,2$, pH optimal de croissance pour *Salmonella*, et de tamponner le milieu au cours de

l'enrichissement. La forte concentration en NaCl a pour but d'inhiber les entérocoques.

b. Suppléments de revivification.

Pyruvate de Na 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L, Thioglycolate de Na, 0,5 à 5 g/L, concentration préférée 2,5 g/L, Catalase 5 000 u/L.

Le pyruvate et le thioglycolate de Na est ajouté pour participer à la stimulation du métabolisme des organismes stressés (Bailey and Cox, 1992). La catalase intervient dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour les microorganismes et potentiellement présents dans les aliments. La température d'incubation est comprise entre 20 et 40°C, de préférence 35°C.

c. Complément d'induction de l'activité caprylate estérase.

Le 4-nitrophényl caprylate est un substrat de la caprylate estérase; sa présence dans le bouillon d'enrichissement permet l'induction de l'expression de cette enzyme et sa détection par cytométrie en flux.

d. Complément sélectif.

Vert brillant 1 à 10 mg/L, concentration préférée 5 mg/L, pour inhiber la croissance des bactéries Gram +, Sulfapyridine à 1g/L pour inhiber le développement des *E. coli* notamment.

Ces compléments ne génèrent pas d'autofluorescence contrairement aux compléments utilisés traditionnellement (par exemple sodium taurocholate ou autres sels billiaires, rouge de phénol, citrates ferriques...) qui sont responsables soit d'une forte autofluorescence du milieu, soit de la formation d'incrustations (corps réfringents) dans les bactéries. La température d'incubation, en présence des suppléments d'induction de l'activité caprylate estérase et des suppléments sélectifs, est de 20 à 40°C (de préférence 35°C). La durée d'incubation en présence de ces suppléments est de 6 à 15 heures en fonction du seuil de détection recherché.

2) Immunoconcentration

La réaction est réalisée avec des billes magnétiques (par exemple les Dynabeads®-Salmonella, diamètre 2,8 µm, Dynal Biotech) selon les recommandations du fournisseur.

5 Différents anticorps sont utilisés sur les billes :

- un anticorps spécifique de Salmonella du commerce (par exemple référence 2302-50, BD Diagnostic Systems) pour un marquage direct. Cet anticorps dirigé contre les antigènes 1, 4, 5 et 12, permet de détecter les *Salmonella* du groupe D,
- 10 - un sérum spécifique de *Salmonella* développé en inoculant des bactéries inactivées à un lapin, lesdites bactéries ayant au préalable été cultivées dans le bouillon de conditionnement.

Cette étape peut être réalisée indirectement avec une première réaction en présence d'un anticorps primaire (un des deux cités ci-dessus) non greffé sur des
15 billes puis une immuno-concentration réalisée avec des billes recouvertes d'un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire (par exemple Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit IgG, diamètre 2,8 µm, référence 112-01, Dynal Biotech).

20 3) Marquage enzymatique : détection de l'activité caprylate esterase.

Le substrat préférentiellement utilisé est la fluorescéine-dicaprylate. Une solution mère est préparée dans de l'acétone à une concentration de 10 à 400 µM. La concentration finale utilisée est de 1 à 40 µM, de préférence 10 µM. L'incubation en présence du substrat se fait de préférence à 37°C pendant 30 minutes à 1 heure puis
25 les microorganismes sont immédiatement placés à 4°C.

Exemple 3 : détection spécifique de *Staphylococcus aureus*

Procédure pour activer l'enzyme phosphatase, l'expression des antigènes de surface de *Staphylococcus aureus*, et détection par cytométrie en flux.

5 *Staphylococcus aureus* appartient à la famille des micrococaceae. C'est une coque Gram positif, non sporulée, immobile, de diamètre moyen compris entre 0,8 et 1 µm en moyenne. Son métabolisme respiratoire est fermentatif. Il est catalase + et pour la majorité de ces souches coagulase +. Il est responsable de nombreuses maladies : septicémie, conjonctivite, endocardite et ostéomyélite (Sheagren J. N.,
10 1984).

La protéine A et les composants de la paroi cellulaire spécifiques de *Staphylococcus aureus*, sont masqués lorsque les souches sont cultivées sur un milieu d'induction des exopolysaccharides. Ces polysaccharides constituent une capsule et sont produits par environ 90 % des souches de *Staphylococcus aureus*. 11
15 sérotypes capsulaires ont été décrits, mais la plupart des souches isolées appartiennent aux sérotypes 5 et 8 (Arbeit *et al.*, 1984; Sompolinsky *et al.*, 1985). L'expression des sérotypes CP5 et CP8 de *Staphylococcus aureus* est largement influencée par les conditions environnementales et les conditions de croissance bactériennes. La production de CP5 est inhibée par un fort taux d'extrait de levure
20 Dassy et ses collaborateurs (1991) et Ouyang et ses collaborateurs (1999) montrent le même effet inhibiteur de l'extrait de levure sur la production de la microcapsule CP8.

Les anticorps produits contre *Staphylococcus aureus* sont soit capsulaires soit membranaires. Pour une détection immunologique de ces bactéries,
25 il faut utiliser un mélange de ces deux types d'anticorps (comme cela est fait pour le test Pastorex Staph plus, Biorad) ou empêcher la production de la capsule exopolysaccharidique avant de procéder à la réaction de reconnaissance antigène-anticorps. C'est cette deuxième stratégie que nous avons choisi de développer, avec

la mise au point d'une composition de revivification inhibant la production de la capsule polysaccharidique.

1) Compositions

5 a. Base d'enrichissement non sélectif.

Peptone de viande : concentration préférée 8 g/L, peptone de caséine : concentration préférée 2 g/L, extrait de levure : concentration préférée 10 g/L, extrait de viande : concentration préférée 5 g/L. Les peptones de viande et de caséine et les extraits de levure et de viande sont la source d'azote, de carbone, de vitamines et de minéraux. Ils permettent la croissance de *Staphylococcus aureus* et l'inhibition de la formation de la capsule.

b. Supplément de revivification.

Pyruvate de Na 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L, Thioglycolate de Na, 0,5 à 5 g/L, concentration préférée 2,5 g/L, Catalase 5 000 u/L.

15 L pyruvate et le thioglycolate de Na est ajouté pour participer à la stimulation du métabolisme des organismes stressés (Bailey and Cox, 1992). La catalase intervient dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour les microorganismes et potentiellement présents dans les aliments.

c. Complément de répression de l'activité phosphatase alcaline.

20 Phosphate inorganique 0,3 %.

L'activité phosphatase est une des activités associées au pouvoir entérotoxinogènes des germes, et est donc indiquée pour une détection de *Staphylococcus aureus*.

L'activité phosphatase alcaline est constitutive chez *Staphylococcus aureus* (Soro *et al.*, 1990). Cependant, étant réprimée par le phosphate chez certaines souches de *Staphylococcus non aureus* (Soro *et al.*, 1990), il est utile d'ajouter des ions phosphates dans le milieu.

d. Complément sélectif.

Glycine 12 g/L, LiCl 5 g/L, déferoxamine 0,05g/L

Le chlorure de lithium est un inhibiteur des Bactéries à Gram négatif. La glycine est un inhibiteur des bactéries à Gram positif et stimule la croissance des Staphylocoques. La déferoxamine inhibe la croissance de *Staphylococcus epidermis*, qui est le seul staphylocoque avec *S. aureus* à posséder une activité phosphatase.

5

2) Immunoccentration

Différents anticorps peuvent être utilisés sur les billes :

- un sérum spécifique de *Staphylococcus aureus* du commerce (référence 50-L030, AGROBIO) pour une fixation directe de l'anticorps sur les
10 antigènes membranaires,
- un anticorps spécifique de *Staphylococcus aureus* développé en inoculant des bactéries inactivées à un lapin, qui se sont développées dans le milieu de conditionnement.

Cette étape peut être réalisée indirectement avec une première réaction
15 en présence d'un anticorps primaire (un des deux cités ci-dessus) non greffé sur des billes puis une immunoccentration réalisée avec des billes recouvertes d'un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire (par exemple Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit IgG, diamètre 2,8 µm référence 112-01, Dynal Biotech).

20

3) Marquage enzymatique.

a. Détection de l'activité phosphatase alcaline.

Le substrat fluorescéine-diphosphate (référence F-2999, Molecular probes) permet de détecter l'activité phosphatase alcaline. Il est préparé par dissolution dans du Tris-HCl 100 mM pH 8,0 à la concentration de 10 mM, puis
25 dilué à 1 mM dans du PBS. La réaction de marquage se fait avec 25 µl de la dilution, ajoutés au surnageant de décrochage de l'immunoccentration et à 125 µl de PBS pendant 15 min à 37°C. Au cours de la réaction, la fluoresceine est libérée et devient fluorescente (excitation/émission 490/514 nm).

Ce marqueur présente une spécificité vis à vis de certaines espèces de Staphylocoques (*aureus* et *epidermis*) de *Micrococcus luteus*, d'*Escherichia coli*, et de quelques espèces de Streptocoques. La combinaison du bouillon et de l'immuno-concentration permet d'éliminer les souches susceptibles d'être positives au marquage fluorescent. La deferroxamine inhibe la croissance de *Staphylococcus epidermis*.

Exemple 4 : Détection d'*Escherichia coli*

Procédure pour activer l'enzyme glucuronidase, l'expression des
10 antigènes de surface de *Escherichia coli* et la détection par cytométrie

Thomas ESCHERICH a découvert cette bactérie en 1855. De la famille des *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce ; mais il existe plus de 1000 types antigéniques. Ces sérotypes sont définis selon leurs antigènes somatiques O (171), capsulaires K (80)
15 et flagellaires H (56). De plus, les antigènes K sont subdivisés en types A, B ou L. Le type B est rencontré exclusivement dans les souches associées aux diarrhées infantiles.

Assez courte (2 à 3 μm x 0,7 μm), on la trouve isolée ou groupée par 2
ou plus rarement en amas. Elle peut apparaître sous forme cocco-bacillaire ou
20 filamenteuse dans les cultures âgées. Sa mobilité péritriche est très réduite, voire nulle (ex sérotype O111). Sa culture est très facile avec une grande tolérance de variation de pH (pH optimum 7,5). La température optimale de croissance est de 37°C, mais elle pousse entre 15°C et 45°C et se multiplie encore à + 5°C. Elle résiste bien à la chaleur : incubée à 45°C, elle fermente le glucose, le mannitol et le
25 lactose avec production importante de gaz. Elle résiste à l'acidité et à la congélation. Elle reste relativement sensible aux antibiotiques et comme toutes les entérobactéries elle réduit les nitrates en nitrites. Elle fermente le glucose et le lactose et irrégulièrement le saccharose et la salicine. La plupart possèdent une activité lysine décarboxylase.

E. coli est un germe habituel de la flore intestinale de tous les animaux, y compris les humains. C'est un commensal de l'intestin qui représente 80 % de la flore intestinale aérobie. Le germe se retrouve dans les matières fécales. De là, il se répand dans la nature : sol et eaux. Sa présence dans le milieu environnant signe toujours une contamination fécale. Sa mise en évidence dans l'eau constitue le principe des tests colorimétriques.

On retrouve des *Escherichia coli* principalement dans les viandes crues ou insuffisamment cuites (bœuf, volaille) et les matières fécales d'origine animale et humaine. L'opération de hachage des viandes constitue une source de contamination favorisée par ce germe. Normalement, *E. coli* a plutôt une fonction de suppression de bactéries nuisibles et permet de synthétiser de nombreuses vitamines, car seule une minorité de souches d'*E. coli* sont capables de causer des infections humaines.

Les *Escherichia coli* sont classés en plusieurs groupes ou pathovars en fonction de leur pathogénicité. Cette pathogénicité est presque toujours basée sur une capacité d'adhésion à différents récepteurs cellulaires. Les *Escherichia coli* appartenant à ces pathovars sont distingués sérologiquement par :

- des antigènes somatiques O : il existe 180 variétés dont une trentaine sont fréquemment rencontrées chez les souches pathogènes ECEP de type I (026, 055, 086, 0111, 0119, 0125-0128, 0142...), ECEP de type II (018, 044, 0112, 0114...), ECEI (028, 029, 0124, 0136, 0143, 0152...), ETEC (06, 08, 015, 020, 025...) ECEH (026, 0113, 0121, 0145, 0157...),

- des antigènes capsulaires K de nature polysaccharidique A ou B (une dizaine de types importants de B chez les ECEP ou de nature protéique L (de pili en particulier les antigènes CFA),

- des antigènes flagellaires H, importants pour les ECEH dont le sérotype le plus courant est O157 : H7.

La plupart des souches pathogènes est caractérisée par un sérotype particulier de type O_xK_yH_z.

Lorsqu' *E. coli* est responsable d'une diarrhée aiguë, on peut le classer selon quatre pathotypes; entéropathogène (EPEC), entéroenvahisseur (ou entéroinvasifs -EIEC), entérohémorragiques (EHEC) et entérotoxigène (ETEC). Les souches se caractérisent par leur capacité de produire une entérotoxine dont
 5 l'action sur les entérocytes perturbe les fonctions d'absorption normalement assurées par la muqueuse intestinale. Ces microorganismes peuvent être présents dans certains aliments, comme le bœuf haché, et dans l'eau où ils trahissent une contamination fécale.

Il peut, s'il arrive à franchir les muqueuses intestinales (lésions de la
 10 paroi intestinale), devenir pathogène et peut déterminer des infections urinaires, biliaires, génitales appelées colibacillooses, et très exceptionnellement une septicémie. Il se comporte en pathogène opportuniste.

1) Compositions

15 a. Base d'enrichissement non sélectif.

Tryptone peptone 10 à 30 g/L, concentration préférée 20 g/L ; Extrait de levure 5 à 15 g/L, concentration préférée 10 g/L ; NaCl 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L ; D-Lactose 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L ; Na_2HPO_4 5 à 15 g/L, concentration préférée 9,6 g/L, KH_2PO_4 0,5 à 3 g/L, concentration préférée
 20 1,35 g/L

La tryptone peptone et l'extrait de levure sont la source d'azote, de carbone, de vitamines et de minéraux. Ils permettent la production des antigènes. Les sels de Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 permettent de tamponner le milieu.

b. Suppléments de revivification.

25 Pyruvate de Na 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L, Thioglycolate de Na, 0,5 à 5 g/L, concentration préférée 2,5 g/L, Catalase 5 000 u/L

Le pyruvate et le thioglycolate de Na est ajouté pour participer à la stimulation du métabolisme des organismes stressés (Bailey and Cox, 1992). La

catalase intervient dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour les microorganismes et potentiellement présents dans les aliments.

c. Complément d'induction de l'activité glucuronidase.

Le 4 nitrophényl β ,D-glucuronide est un substrat de la glucuronidase; sa
5 présence dans le milieu de conditionnement permet l'induction de l'expression de
cette enzyme et sa détection par cytométrie en flux. Il est ajouté au milieu de
conditionnement dans les proportions variant de 0,5 à 5 mM, de préférence 1 mM
final.

d. Complément sélectif.

10 Sels biliaires 0,5 à 5 g/L, de préférence 1,5 g/L

Ils sont utilisés pour inhiber le développement des bactéries Gram +,
particulièrement les bactéries sporulantes et les streptocoques fécaux, et pour
stimuler la croissance d'*Escherichia coli*. La température d'incubation en présence
des suppléments d'induction de l'activité glucuronidase et des suppléments sélectifs
15 est de 20 à 50°C, de préférence 37°C.

La durée d'incubation en présence de ces suppléments est de 6 à 15
heures en fonction du seuil de détection recherché.

2) Immunoconcentration

20 Différents anticorps peuvent être utilisés et greffés sur les billes :

- un anticorps spécifique de *Escherichia coli* du commerce pour un
marquage direct,
- un anticorps spécifique de *Escherichia coli* développé en inoculant
des bactéries inactivées à un lapin, lesdites bactéries ayant préalablement poussé
25 dans le milieu de conditionnement.

Cette étape peut être réalisée indirectement avec une première réaction
en présence d'un anticorps primaire (un des deux cités ci-dessus) non greffé sur des
billes puis une immunoconcentration réalisée avec des billes recouvertes d'un

anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire (par exemple Dynabeads M-280 sheep anti-rabbit IgG, diamètre 2,8 µm référence 112-01, Dynal Biotech).

3) Marquage enzymatique : détection de l'activité glucuronidase

5 Le substrat préférentiellement utilisé est l'acide fluorescéine-di-β-D-glucuronique. Une solution mère est préparée à une concentration de 10 mM dans un mélange H₂O/DMSO/EtOH en proportions 8:1:1. Une solution de travail est préparée à 2 mM dans H₂O. La concentration finale utilisée est de 50 à 500 µM, de préférence 160 µM.

10 L'incubation en présence du substrat se fait de préférence à 37°C pendant 30 minutes à 1 heure. Les bactéries sont perméabilisées temporairement par addition de 15 µl d'isopropanol pendant 5 minutes à 37°C. Les microorganismes fluorescents sont alors immédiatement placés à 4°C avant analyse.

15 Exemple 5 : Détection de *Mycobacterium avium paratuberculosis*

Procédure pour activer l'enzyme palmitate estérase et l'expression des antigènes de surface de *Mycobacterium avium paratuberculosis*, et détection par cytométrie en flux

20 *Mycobacterium avium paratuberculosis* est une bactérie à Gram positif et alcool-résistante qui mesure de 0,5 à 1,5 µm. Elle forme des colonies blanches et rugueuses sur le milieu de culture Herrold's egg yolk (HEYM). Il s'agit d'un micro-organisme au développement très lent : les colonies sur un milieu solide sont visibles après 3 à 4 mois de culture. La présence de suppléments nutritifs dans le milieu n'améliore pas sa vitesse de croissance (Cocito *et al.*, 1994).

25 Les mycobactéries sont notamment résistantes aux facteurs physiques et chimiques. *M. avium paratuberculosis* est apparemment l'une des bactéries les plus résistantes de cette famille, ce qui explique sa capacité à survivre si longtemps dans l'environnement. Certains facteurs sont susceptibles de diminuer son temps de

survie dans l'environnement : la sécheresse, l'exposition au soleil, un pH supérieur à 7,0 et un terrain pauvre en fer.

M. avium paratuberculosis est proche phylogénétiquement d'autres espèces appartenant à la même famille : il présente une homologie de l'ADN supérieure à 99 % avec *M. avium avium*. Cette forte homologie génétique se traduit, en conséquence, par un nombre élevé d'antigènes communs. Cela représente un problème non négligeable lorsqu'on utilise des tests immunologiques directs pour détecter spécifiquement les souches de *M. avium paratuberculosis*.

Les techniques actuelles couramment utilisées par les laboratoires d'analyses pour la détection de la bactérie *Mycobacterium avium paratuberculosis* repose sur trois technologies différentes : la sérologie, la méthode PCR, la coproculture.

L'analyse sérologique est une méthode indirecte basée sur la détection des anticorps anti *Mycobacterium avium paratuberculosis* ; elle permet d'obtenir des résultats en 24 heures, mais l'absence d'antigènes spécifiques dirigés contre les anticorps anti-mycobacterium, rend ces tests moins sensibles que la coproculture (37 %).

La technique PCR est une analyse directe, rapide (24 heures), sensible, mais ne permettant pas de mesurer ni de différencier les bactéries mortes des vivantes. C'est un problème d'importance lorsque l'on veut analyser des produits alimentaires qui ont subi une stérilisation. En effet, il peut persister dans des produits ayant subi un stress physique important de l'ADN provenant de bactéries mortes. Une méthode de détection de l'ADN donnerait donc des résultats faussement positifs.

La coproculture est une méthode sensible, fiable, mais très longue : les résultats sont obtenus en 3 à 4 mois.

Le protocole présenté ci-dessous décrit une méthode d'analyse, à partir de fèces bovins, permettant de déterminer la présence de *Mycobacterium avium paratuberculosis* et de la quantifier dans un délai court (5 à 7 jours).

Par ailleurs, la quantité de bactéries pathogènes présentes dans les fèces varie de façon importante au cours du cycle de l'infection ; aussi, une étape de revivification / enrichissement de la bactérie est introduite afin d'améliorer la sensibilité de la détection, notamment lors des stades précoces de développement de l'infection à *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

1) Compositions

a) Base d'enrichissement non sélectif.

Infusion Cœur-Cerveau 37 g/L, Glycérol 2,7 %, Asparagine 2g/L; Tween 80 0,1 %, Mycobactine J 2ml (Synbiotics Corporation ; réf. AMCE), Sérum de veau fœtal 10% (SVF ; Invitrogen). Ce milieu de conditionnement est une préparation permettant dans un premier temps de revitaliser les bactéries stressées et/ou ayant une activité métabolique réduite et dans un second temps, de favoriser sélectivement, la croissance de *Mycobacterium avium paratuberculosis* dans le milieu.

b) Supplément de revivification.

Pyruvate de Na 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L, Thioglycolate de Na , 0,5 à 5 g/L, concentration préférée 2,5 g/L, Catalase 5 000 u/L.

Le pyruvate et le thioglycolate de Na est ajouté pour participer à la stimulation du métabolisme des organismes stressés (Bailey and Cox, 1992). La catalase intervient dans l'élimination des espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour les microorganismes et potentiellement présents dans les aliments.

c) Complément sélectif.

Acide nalidixique 50 mg/L, Vancomycine à 50 mg/L.

d) Complément d'induction.

Le 4-nitrophényl palmitate concentration de 0,5 à 5 mM, concentration préférée 2 mM.

L'enzyme palmitate estérase est une enzyme inductible chez *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Le 4-nitrophenyl-palmitate est un substrat

de cette enzyme. Son addition dans le bouillon de conditionnement permet l'induction de l'expression de cette enzyme et sa détection par cytométrie en flux.

Les bactéries du *Mycobacterium avium paratuberculosis* présentes dans les fèces bovins, bien que possédant un potentiel infectieux important, ne sont pas aptes dans la plupart des cas à se développer rapidement dans un milieu approprié. Soit elles sont stressées par leur environnement, soit elles présentent une activité métabolique réduite, qui est à l'origine de leur croissance très lente. Le pyruvate de sodium utilisé dans le milieu MCD8 possède des propriétés de revivification en agissant probablement sur le cycle de Krebs. Par ailleurs, il est admis qu'un milieu riche en acides gras, et particulièrement en acide palmitique et acide oléique (Tween 80), favorise le développement des microorganismes et particulièrement de *Mycobacterium avium paratuberculosis*. La mycobactine J, en agissant comme un chélateur d'ions Fe^{2+} , favorise l'entrée de cet ion indispensable à la croissance du mycobactérium. Enfin, le développement de *Mycobacterium avium paratuberculosis* s'accompagne toujours d'une libération de molécules toxiques de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La catalase, présente dans le milieu, permet d'éliminer ces produits issus du métabolisme cellulaire. Les deux antibiotiques, à large spectre, additionnés au milieu permettent de limiter le développement d'autres souches bactériennes initialement présentes dans les fèces. La phase d'enrichissement dans le milieu de conditionnement est préconisée pour une durée minimale de 5 jours ; de très bons résultats sont obtenus avec 7 jours d'incubation.

2) Immuno concentration

Différents anticorps peuvent être utilisés et greffés sur les billes :

- un anticorps spécifique de *Mycobacterium avium* du commerce pour un marquage direct (Biodesign International),
- un anticorps spécifique de *Mycobacterium avium paratuberculosis* développé en inoculant des bactéries inactivées à un lapin, lesdites bactéries ayant préalablement poussé dans le milieu de conditionnement.

Cette étape peut être réalisée indirectement avec une première réaction en présence d'un anticorps primaire (un des deux cités ci-dessus) non greffé sur des billes puis une immunoconcentration réalisée avec des billes recouvertes d'un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire (par exemple Dynabeads M-
5 450 Goat anti-mouse IgG, diamètre 4,5 µm Dynal Biotech).

3) Marquage enzymatique

A la suite de l'étape d'immuno-concentration magnétique, *Mycobacterium avium paratuberculosis* est révélé par un fluorochrome spécifique
10 de son activité enzymatique globale. Ce marquage permet de mettre en évidence les bactéries vivantes, potentiellement infectieuses et virulentes.

a. Détection de l'activité palmitate estérase.

Le substrat préférentiellement utilisé est la fluorescéine-di-palmitate. Une solution mère est préparée dans de l'acétone à une concentration de 10 à 400
15 mM. La concentration finale utilisée est de 1 à 40 µM, de préférence 10 µM. L'incubation en présence du substrat se fait de préférence à 37°C pendant 30 min à 1 heure. Les microorganismes fluorescents sont alors immédiatement placés à 4°C avant analyse

20 Exemple 6 : Détection de *Legionella pneumophila*

Legionella est un bacille à Gram négatif, non sporulé, aérobic strict et mesurant de 0,2 à 0,5 µm. De forme coccobacillaire dans les tissus infectés ; il est présent sous une forme filamenteuse sur milieu artificiel, où il forme des colonies grisâtres et polymorphes. Le genre *Legionella* comprend actuellement 43 espèces et
25 64 sérogroupes. Leur habitat naturel est l'eau, et est couramment reconnu comme parasite intra-cellulaire des amibes. Responsable de pathologies chez l'homme (les légionelloses), *Legionella pneumophila* 1 est le séro groupe le plus fréquemment rencontré en pathologie (80 % des cas).

Les facteurs favorisant la multiplication de *Legionella* sont la température de l'eau, la présence de biofilms, la présence d'amibes et la stagnation de l'eau.

5 *Legionella* se caractérise notamment par une richesse en acides gras ramifiés, inhabituelle pour les germes à Gram négatif. Elle exige pour sa culture de la L-cystéine et du pyrophosphate ferrique, qui sont des facteurs de croissance indispensables, mais elle n'hydrolyse pas les sucres et ne pousse pas sur des milieux gélosés au sang. Enfin, elle résiste à des traitements thermiques et acides forts (100° C pendant 10 min ; HCL 0,2 M).

10 Sur milieu artificiel, l'incubation de *Legionella* est réalisée à 36°C pendant 10 jours. avec des lectures à 3, 7 et 10 jours ; sa croissance est favorisée par 2,5 % de CO₂.

15 L'identification de *Legionella* peut être réalisée de deux manières distinctes : un examen direct par un test d'immuno-agglutination au latex ou par immunofluorescence à l'aide d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ; une culture sur milieu sélectif. L'examen direct présente comme avantage d'être hautement spécifique, permettant ainsi une identification précise du sérotype ; cependant, cette méthode reste peu sensible et nécessite un minimum de 10 000 germes/mL pour permettre d'obtenir un résultat. Ces techniques sont donc utilisées afin d'identifier
20 les espèces et sérogroupes à la suite d'une culture sur milieu sélectif.

La culture sur milieu sélectif gélosé présente comme avantage d'être relativement sensible (seuil de détection minimum à 50 UFC/mL), mais ne permet d'obtenir qu'une présomption de présence de *Legionella*. Cette technique doit, obligatoirement, être complétée par des examens directs (immunofluorescence
25 directe ou immuno-agglutination de billes de latex) ou par des techniques de biologie moléculaire (PCR). Ces deux techniques présentent par conséquent comme inconvénient majeur d'être longues : 10 jours avant d'obtenir un résultat négatif.

1) Compositions

a) Base d'enrichissement non sélectif.

Extrait de levure 10 g/L, ACES 10 g/L, Alpha-cétoglutarate 1 g/L;
Charbon activé 4 g/L ; pH $6,9 \pm 0,2$; L-cystéine 0,4 g/L ; Pyrophosphate ferrique
5 0,25 g/L.

b) Supplément de revivification.

Pyruvate de Na 1 à 10 g/L, concentration préférée 5 g/L, Thioglycolate
de Na , 0,5 à 5 g/L, concentration préférée 2,5 g/L, Catalase 5 000 u/L.

c) Complément sélectif.

10 Polymixine B 5 mg/L, 2 mg de Vancomycine hydrochlorique 2 mg/L,
Cycloheximide 16 mg/L.

Le milieu de conditionnement *Legionella* possède comme base de
formulation les composants décrits par Pine *et al.* (1979); l'extrait de levure et le
tampon ACES, la glycine et la L-cystéine sont les composants classiques des milieux
15 de cultures permettant l'apport de facteurs de croissance, de sels minéraux et
d'acides aminés indispensables au développement de *Legionella* ; l' α -
cétoglutarate est connu comme un puissant activateur de la croissance de la bactérie.

Enfin, *Legionella pneumophila* produisant au cours de sa croissance une
grande quantité de radicaux libres, ce qui est incompatible avec son développement,
20 le charbon activé permet d'éliminer ces molécules toxiques. La durée d'incubation
dans le milieu de conditionnement est de 24 à 72 heures, préférentiellement 48
heures, à une température d'incubation comprise entre 20 et 50°C, de préférence
d'environ 37°C.

25 2) Immuno concentration.

Différents anticorps peuvent être utilisés et greffés sur les billes :

- un anticorps spécifique de *Legionella pneumophilla* du commerce
pour un marquage direct (Abcam UK),

- un anticorps spécifique de *Legionella pneumophilla* développé en inoculant des bactéries inactivées à un lapin, lesdites bactéries ayant préalablement poussé dans le milieu de conditionnement.

Cette étape peut être réalisée indirectement avec une première réaction
5 en présence d'un anticorps primaire (un des deux cités ci-dessus) non greffé sur des billes puis une immunoconcentration réalisée avec des billes recouvertes d'un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire (par exemple Dynabeads M-450 Goat anti-mouse IgG, diamètre 4,5 µm, Dynal Biotech).

10 3) Marquage enzymatique

Rhodamine 123, 200 mM

La Rhodamine 123 est un marqueur fluorescent du potentiel
membranaire. Une altération de ce dernier entraîne une incorporation moindre de ce
fluorochrome dans les cellules. La répartition de cette sonde est de 1 unité à
15 l'extérieur de la cellule, 10 000 dans le compartiment cytoplasmique. Cette
spécificité cellulaire alliée au mode d'incorporation (potentiel dépendant), fait que
la fluorescence émise traduit l'activité globale de la cellule.

La Rhodamine 123, composante du milieu de conditionnement, va être
incorporée au cours de la multiplication de *Legionella* à l'intérieur des
20 microorganismes, et permettre ainsi d'obtenir des bactéries fluorescentes à la
longueur d'onde d'émission optimale de 633 nm.

Par ailleurs, l'adjonction d'antibiotiques à larges spectres permet
d'éliminer les contaminations éventuelles de l'échantillon par des bactéries souvent
associées à *Legionella*, tels que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*.
25 Ces antibiotiques, agissant en découplant le potentiel membranaire, induisent un
faible ou une absence de marquage par la Rhodamine 123.

REFERENCES

- . Alvarez-Barrientos *et al.* (2000) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews. 13 : 167-195.
- 5 . Amann (1995) Fluorescently labelled rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Mol. Evol. 4 : 543-554.
- . Arbeit *et al.* (1984) Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolated of *Staphylococcus aureus*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2 : 85-91.
- 10 . Bailey and Cox (1992).
- . Barer *et al.* (1999) Bacterial viability and culturability. Advances in Microbial Physiology; 41 : 93-137.
- . Birk *et al.* (1997) Synthesis of isopropyl-1-thio-beta-D-glucopyranoside (IPTGlc), an inducer of *Aspergillus niger* B1 beta-glucosidase production. Appl Biochem
- 15 Biotechnol. 66 : 25-30.
- . Brewer *et al.* (1995) Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterase in *Saccharomyces cerevisiae*, which results in accumulation of fluorescent product. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 1614-1619.
- 20 . Cocito *et al.* (1994) Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 7 : 328-345.
- . Dassy *et al.* (1991) Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. J. Gen. Microbiol. 137 : 1155-1162.
- . Davey *et al.* (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. Microbiological Reviews. 60 :
- 25 641-696.
- . Dudley (1991) Journal of Clinical Immunoassay 14 : 77-82.
- . Garcia-Armesto *et al.* (1993) Modern microbiological methods for foods : colony count and direct count methods. A review. Microbiologia SEM. 9 : 1-13.

- . Grant *et al.* (1998) Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 : 3153-3158.
- . Gregori *et al.* (2001) Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in
5 freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 : 4662-4670.
- . House *et al.* (2001) Current Opinion in Infectious Disease. 14 : 573-578.
- . Humbert *et al.* (1989) Rapid identification of *Salmonella* from poultry meat products by using "Mucap test". *Int. J. Food Microbiology*. 8 : 79-83.
- 10 . Iannelli *et al.* (1998). Simultaneous identification of antibodies to *Brucella abortus* and *Staphylococcus aureus* in milk samples by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 36 : 802-806.
- . Kramer et Jones (1969) Media selective for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*. 32 : 381-394.
- 15 . Lopez-Amoros *et al.* (1995) Flow cytometric assessment of *Escherichia coli* and *Salmonella* starvation-survival in seawater using Rhodamine 123, Propidium iodide and oxonol. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2521-2526.
- . Manafi M. (2000) New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*. 60. 205-218.
- 20 . Mason *et al.* (1995) *Journal of Applied Bacteriology*. 78 : 309-315.
- . McClelland *et al.* (1994) Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology*. 60:4255-4262.
- . Moter *et al.* (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct
25 visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 41: 85-112.
- . Nebe-von Caron *et al.* (1995) Viability assement of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *J. Microsc.* 179 : 55-66.
- . Nedergaard *et al.* (1990) Dicarboxy-dichlorofluorescein : a new fluorescent probe for measuring acidic intracellular pH. *Anal. Biochem.* 187 : 109-114.

- . Notermans *et al.* (1991) Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 2666-2670.
- 5 . Olsson *et al.* (1991). Identification of *Salmonellae* with the 4-methylumbelliferyl caprilate fluorescence test. *J. Clin. Microbiol.* Vol 29, p 2631.
- . Ouyang *et al.* (1999) Promoter analysis of the cap8 operon, involved in type 8 capsular polysaccharide production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 181 : 1155-1162.
- 10 . Perez-Pons *et al.* (1995) Induction and preliminary characterization of intracellular beta-glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strain. *FEMS Microbiological Letters*. 128 : 235-239.
- . Pinder *et al.* (1994) Rapid immunoassay for pathogenic *Salmonella* organisms by immunofluorescence flow cytometry. *Journal of Microscopy*. 176 : 17-22.
- 15 . Robinson J.P. (1999) Overview of flow cytometry. In *Current Protocols in Cytometry* 11.1.1-11.1.4.
- . Salzman *et al.* (1982) Rapid identification of microorganisms by circular-intensity differential scattering. *Appl. Env. Microbiol.* 44 : 1081-1085.
- . Seo *et al.* (1998) Immunomagnetic separation and flow cytometry for rapid detection of *Escherichia coli* O157 :H7. *J. Food Protect.* 61 : 812-816.
- 20 . Sheagren J. N. (1984) *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen. *N. Engl. J. Med.* 310 : 1368-1373 et 1437-1442.
- . Skjerve *et al.* (1991). Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods. *International Journal of Microbiology*. 14 : 11-18.
- 25 . Skjerve *et al.* (1990) Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 : 3478-3481.
- . Sompolinsky *et al.* (1985) *J. Clin Microbiol.* 22 : 828-834.
- . Soro *et al.* (1990) *J. Clin. Microbiol.* 28 : 2707-2710.

- . Steen (1986) Simultaneous separate detection of flow angle and large angle light scattering in an arc lamp-based flow cytometer. *Cytometry*. 7 : 445-449.
- . Swaminathan *et al.* (1995) in Muray *et al.* Eds Manuel of Clinical Microbiology. American Society of Microbiology. Washington DC.
- 5 . Tomayasu *et al.* (1998) Improvement of the immunomagnetic separation method selective for *Escherichia coli* 0157 strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 : 376-382.
- . Tortorello *et al.* (1994) Antibody-direct epifluorescent filter technique for rapid direct enumeration of *Escherichia coli* 0157 :H7 in beef. *Applied and Environmental*
10 *Microbiology*. 60 : 3553-3559.
- . Tortorello *et al.* (1998) Quantitative analysis and isolation of *Escherichia coli* 0157 :H7 in a food matrix using flow cytometry and cell sorting. *FEMS Immunology in Medical Microbiology*. 19 : 267-274.
- . Venturi *et al.* (2002) Extracellular beta-D-glucosidase from *Chaetomium*
15 *thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties. *Journal of Basic Microbiology*. 42 : 55-66.
- . Vlieger *et al.* (1992) Quantitation of polymerase chain reaction products by hybridization-based assays with fluorescent, colorimetric, or chemiluminescent detection. *Analytical biochemistry* 205 : 1-7.
- 20 . Wallner *et al.* (1995) Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 1859-1866.
- . Yang *et al.* (1996) *Biol. Pharma Bull.* 19 : 701-704.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de détection et de comptage de microorganismes dans un échantillon comprenant les étapes de :
 - 5 a) enrichissement sélectif du microorganisme recherché dans l'échantillon,
 - b) conditionnement dudit microorganisme,
 - c) concentration immunomagnétique du microorganisme conditionné,
 - d) marquage fluorescent du microorganisme concentré, et
 - 10 e) détection et analyse de la fluorescence.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement est réalisée dans une composition comprenant :
 - du pyruvate de sodium à une concentration comprise entre 1 à 20 g/L, de préférence entre 1 à 10 g/L et plus préférentiellement 4 à 6 g/L,
 - 15 - du thiosulfate de sodium à une concentration comprise entre 0,5 et 5 g/L, de préférence entre 0,5 et 3 g/L et plus préférentiellement encore environ 2 g/L,
 - de la catalase à une concentration comprise entre 500 et 20 000 u/L, de préférence entre 2 000 et 8 000 u/L et plus préférentiellement encore environ 5 000 u/L.
- 20 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite composition comprend en outre au moins un antibiotique.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape de conditionnement est une étape d'induction d'au moins une activité enzymatique
25 spécifique du microorganisme recherché comprenant l'ajout au milieu d'enrichissement du microorganisme d'au moins un substrat non fluorescent spécifique de ladite ou desdites enzyme(s).

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les étapes a) et b) peuvent être réalisées simultanément.
6. Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que l'étape c) peut avoir lieu avant l'étape b) ou l'étape c) peut avoir lieu après l'étape d).
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape de conditionnement, dans le cas où le microorganisme recherché est une bactérie Gram⁺, comprend de plus une étape d'induction d'au moins un antigène de surface caractéristique du microorganisme recherché comprenant l'ajout au milieu d'enrichissement du microorganisme d'un extrait de levure à une concentration comprise entre 5 et 50 g/L, de préférence entre 10 et 20 g/L et plus préférentiellement entre environ 10 g/L.
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'étape de concentration immunomagnétique comprend les étapes de :
 - a) mise en contact du microorganisme recherché, présent dans le milieu de conditionnement, avec un anticorps dirigé contre un antigène spécifique de ce microorganisme, ledit anticorps étant greffé sur une bille magnétique,
 - b) séparation des complexes billes-anticorps-microorganisme du milieu,
 - c) séparation du microorganisme du reste du complexe.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que l'anticorps greffé sur une bille magnétique est dirigé contre un anticorps lui-même dirigé contre un antigène spécifique du microorganisme recherché.
10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que les billes magnétiques ont un diamètre compris entre 1 et 20 μm , de préférence entre 2 et 8 μm .

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que le marquage fluorescent des microorganismes recherchés est réalisé par l'ajout au milieu contenant lesdits microorganismes d'au moins un substrat comprenant une partie spécifique de l'activité enzymatique à révéler et une partie marqueur.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la partie marqueur est constituée d'un marqueur fluorogène excité à 488 nm choisi dans le groupe comprenant : la fluorescéine, la phycoérythrine, la cyanine et l'esculine.
13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la partie du substrat spécifique de l'activité enzymatique à révéler est choisie parmi un acide gras, d'un ose, d'un phosphate et/ou d'un sulfate.
14. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la détection et l'analyse de la fluorescence permettant la numération des microorganismes sont réalisées par une technique choisie dans le groupe comprenant : la cytométrie en flux, la cytométrie sur filtre et la microscopie de fluorescence.
15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les étapes a), b), c), d) et e) telles que définies dans la revendication 1 sont précédées d'une étape de filtration de l'échantillon à analyser.
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la filtration réalisée au moyen d'un filtre dont la porosité est comprise entre 20 et 150 microns, de préférence entre 30 et 100 microns et plus préférentiellement encore d'environ 63 microns.

17. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que la filtration est réalisée sur une membrane présentant une porosité comprise entre 0,2 et 10 μm , de préférence entre 0,2 et 5 μm et plus préférentiellement encore entre 0,2 et 0,5 μm .

5

18. Milieu d'enrichissement sélectif d'un microorganisme recherché dans un échantillon comprenant :

- une composition nutritive permettant la multiplication dudit microorganisme,
- une composition de revivification sélective dudit microorganisme.

10

19. Milieu d'enrichissement selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend :

- du pyruvate de sodium à une concentration comprise entre 1 à 20 g/L, de préférence entre 1 à 10 g/L et plus préférentiellement 4 à 6 g/L,
- du thiosulfate de sodium à une concentration comprise entre 0,5 et 5 g/L, de préférence entre 0,5 et 3 g/L et plus préférentiellement encore environ 2 g/L,
- de la catalase à une concentration comprise entre 500 et 20 000 u/L, de préférence entre 2 000 et 8 000 u/L et plus préférentiellement encore environ 5 000 u/L.

20

20. Milieu d'enrichissement selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce qu'il comprend de plus au moins un agent antimicrobien.

reçue le 08/01/03

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg


75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ...1/1.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

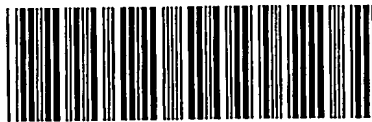
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 V / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif) 240090 D20660 FFP		
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02/12/119
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE DETECTION ET DE COMPTAGE DE MICROORGANISMES DANS UN ECHANTILLON		
LE(S) DEMANDEUR(S) : METIS BIOTECHNOLOGIES : Pépinière d'entreprises Ester Technopole, 87000 LIMOGES - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		VEDRINE Bruno
Prénoms		
Adresse	Rue	"La Souche"
	Code postal et ville	63230 PONTGIBAUD
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		LACHAISE Aline
Prénoms		
Adresse	Rue	"Payaux"
	Code postal et ville	87570 RILHAC-RANCON
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		CARRE Vincent
Prénoms		
Adresse	Rue	"Catheraud"
	Code postal et ville	87370 JABREILLES-LES-BORDES
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 02-12-04		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PCT Application
FR0302873



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.